

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

Rec'd PCT/PTO 29 SEP 2004

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

PCT

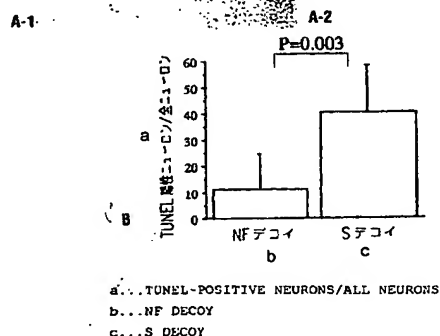
(10) 国際公開番号
WO 03/082331 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, 48/00, 31/711, A61P 25/00, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/03239
- (22) 国際出願日: 2002 年 3 月 29 日 (29.03.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アンジェス エムジー株式会社 (ANGES MG, INC.) [JP/JP]; 〒560-0082 大阪府 豊中市 新千里東町一丁目 4 番 2 号 Osaka (JP).
- (72) 出願人 および
(72) 発明者: 澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田市 山田丘 2-2 大阪大学大学院医学研究科内 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 森下 竜一 (MORISHITA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田市 山田丘 2-2 大阪大学大学院医学研究科内 Osaka (JP). 金田 安史 (KANEDA, Yasufumi) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田市 山田丘 2-2 大阪大学大学院医学研究科内 Osaka (JP). 松田 暉 (MATSUDA, Hikaru) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田市 山田丘 2-2 大阪大学大学院医学研究科内 Osaka (JP). 吉峰 俊樹 (YOSHIMINE, Toshiki) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田市 山田丘 2-2 大阪大学大学院医学研究科内 Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: DECOY COMPOSITIONS FOR TREATING AND PREVENTING BRAIN DISEASES AND DISORDERS

(54) 発明の名称: 脳疾患および障害を処置および予防するためのデコイ組成物



(57) Abstract: It is intended to transfection of an NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide into rat cranial nerve via the carotid artery under global brain ischemia. As the results of polymerase chain reaction, it is found out that the transfected NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide effectively inhibits the expression of tumor necrosis factor α , interleukin 1β and intracellular adhesion molecule 1 messenger RNA within 1 hour after the global brain ischemia. As the results of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate

[続葉有]

WO 03/082331 A1



(74) 代理人: 山本 秀策 (YAMAMOTO, Shusaku); 〒540-6015 大阪府 大阪市 中央区 城見一丁目2番27号 クリスタルタワー15階 Osaka (JP).

許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

規則4.17に規定する申立て:

— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

nick end label staining method and microtubule-binding protein 2 immunohistochemistry, it is found out that the transfected NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide significantly relieves nerve injury within 7 days after global brain ischemia. Therapeutic transfection with the NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide during brain ischemia is efficacious in relieving nerve injury, which suggests a strategy for protecting the brain from global ischemia.

(57) 要約: 本発明により、全体的脳虚血中の頸動脈を介するNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドのラット脳神経への導入が提供される。ポリメラーゼ連鎖反応は、トランスフェクトされたNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドが、全体的脳虚血後1時間で効果的に腫瘍壊死因子 α 、インターロイキン1 β 、および細胞内接着分子1メッセンジャーRNAの発現を阻害することを示した。末端デオキリヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介デオキシウリジン三リン酸ニック末端標識染色および微小管結合タンパク質2免疫組織化学は、トランスフェクトされたNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドが、全体的脳虚血後7日で、有意に神経損傷を和らげることを示した。脳虚血中のNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドの治療的トランスフェクションは、神経損傷を和らげるために有効であり得、全体的虚血に対する大脳保護の戦略を示唆する。

明細書

脳疾患および障害を処置および予防するためのデコイ組成物

5

技術分野

本発明は、転写調節因子が結合する部位と特異的に結合する化合物（例えば、核酸およびその類似体）を含む組成物およびその使用方法に関する。より詳細には、本発明は、脳虚血障害を処置するためのデコイ化合物（例えば、核因子 κ B（NF- κ B）デコイ）を含む組成物およびその使用方法に関する。本発明はまた、脳以外の経路により投与することにより脳に遺伝子トランスフェクションを行う方法およびそのための組成物を提供する。

10

背景技術

喘息、癌、心臓病、動脈瘤、自己免疫疾患およびウイルス感染症などの種々の疾患は、それぞれ異なる症状を示すにもかかわらず、その大部分は、1種類または数種類のタンパク質が、異常発現（過剰発現または過少発現）したことに起因することが示唆されている。一般に、これらタンパク質の発現は、種々の転写活性因子および転写抑制遺伝子などの転写調節因子によって制御されている。

15

NF- κ Bは、炎症および免疫などに重要である遺伝子産物をコードする遺伝子のそのような転写因子の1つである（Baue r l e P A. ら、Annu Rev Immunol. 1994; 12: 141-79）。NF- κ Bは、種々の細胞外シグナルに応答して、細胞質から核に迅速にトランスローケートし、そしていくつかのサイトカインおよび接着分子遺伝子の調整されたトランス活性化で中心的な役割を演じる。Cooper らは、心臓同種異系移植モデルにおける拒絶の3日前にピークとなるNF- κ B DNA結合活性の時間依存的増加を

20

25

示した (Cooper M. ら、Transplantation. 1998 Oct 15; 66 (7): 838-44)。しかし、NF- κ Bの強力なインヒビターであるPDTCの投与は、このモデルにおいてNF- κ B活性のピークを低減して移植物の生存を顕著に延長した。

5

ヒトNF- κ Bの通常の活性形態は、2つのDNA結合性サブユニット、50 kDaサブユニット (p50) および65 kDaサブユニット (relAまたはp65) からなるヘテロダイマーである (Lenardo, Cell. 1989 Jul 28; 58 (2): 227-9; Libermann, Mol Cell Biol. 1990 May; 10 (5): 2327-34; Satriano J, J Clin Invest. 1994 Oct; 94 (4): 1629-36; Neish AS ら、J Exp Med. 1992 Dec 1; 176 (6): 1583-93)。刺激を受けていない細胞では、NF- κ Bは、I κ Bとして知られる阻害分子に結合して細胞質内に隠れている。細胞刺激
10 の後、I κ Bは、リン酸化され、そして急速に分解される。次いでNF- κ Bは、I κ Bから放出され、この転写因子の核へのトランスローケーションを可能にし、そこで、それは、種々のDNA認識部位に結合することにより遺伝子発現を調節する (Baeyerle, 1994, 前出)。この複合体からの転写因子NF- κ Bの解離が、インターロイキン (IL) -1、-6、および-8; 細胞内接着
20 因子; 血管細胞接着因子; および内皮細胞接着分子を含む遺伝子の調整されたトランス活性化を誘導することによって、炎症変化の調節で中心的役割を演じることが示唆されている (Lenardo, 1989 前出; Libermann, 1990 前出; Satriano J, 1994 前出; Neish, 1992 前出)。従って、NF- κ Bをブロックすることは、心筋における遺伝子仲介
25 性の虚血再還流を減衰し得る。

NF- κ Bは、腫瘍悪性度の進行の開始に関与し得る (Rayet Bら、Oncogene 1999 Nov 22; 18 (49): 6938-47); NF- κ Bは、低酸素症ストレスに対する腫瘍細胞の応答に関与する (Royds J Aら、Mol Pathol 1998 Apr; 51 (2): 55-61); NF- κ Bは、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞におけるサイトカインおよび接着分子の発現を阻害する (Tomita Tら、Rheumatology (Oxford) 2000 Jul; 39 (7): 749-57); NF- κ Bを含む複数の転写因子間の協力作用の抑制は、種々の癌の悪性表現型を変える (Denhardt DT、Crit Rev Oncog 1996; 7 (3-4): 261-91); 緑茶ポリフェノールによるNF- κ B活性のダウンレギュレーションは、一酸化窒素合成酵素の誘導をブロックし、A431ヒト類表皮癌細胞を抑制する (Lin JKら、Biochem Pharmacol 1999 Sep 15; 58 (6): 911-5); アルツハイマー病患者の脳で見られるアミロイド β ペプチドは、神経芽腫細胞において、75 kD神経栄養因子レセプター (p75NTR) に結合することにより、NF- κ Bを時間依存性様式および用量依存性様式で活性化する (Kuper Pら、J Neurosci Res 1998 Dec 15; 54 (6): 798-804); TNF α は、糸球体腎炎の発症に重要な役割を演じる (Ardailiouら、Bull Acad Natl Med 1995 Jan; 179 (1): 103-15)。

20

NF- κ Bに対する転写因子デコイは、TNF α で誘導されるマウス腎炎においてサイトカインおよび接着分子の発現をインビゴで阻害する (Tomita Nら、Gene Ther 2000 Aug; 7 (15): 1326-32); など。

25

NF- κ Bは、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) のメンバー、M

MP1およびMMP9を転写レベルで抑制することが示唆された (Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J. J Immunol 2000 Nov 15; 165 (10): 5788-97; M, Baker AH, Newby AC. Biochem Biophys Res Commun. Bond 1999 Oct 22; 264 (2): 561-7; Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. FEBS Lett 1998 Sep 11; 435 (1): 29-34; および Kim H, Koh G. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Mar 16; 269 (2): 401-5)。MMPは、細胞外マトリックス成分の分解に関与する亜鉛依存性酵素の多遺伝子ファミリーである。

MMPは、細胞外マトリックスタンパク質の分解を仲介することにより癌細胞侵入において重要な役割を果たす。多くの癌研究によって、MMPおよびMMPのインヒビター (TIMP) が、癌の進行に関与することが示唆されている：血清中のTIMP1レベルは、結腸直腸の予後および診断マーカーとなり、そして転移性癌の選択的マーカーとして用い得る (Pellegrini Pら、Cancer Immunol Immunother 2000 Sep; 49 (7): 388-94); ヒト膀胱癌細胞中のMMP2およびMMP9の発現および活性は、腫瘍壊死因子 α と γ インターフェロンの影響を受ける (Shin KYら、Cancer Lett 2000 Oct 31; 159 (2): 127-134); 卵巣上皮腫瘍で、MMP2、MMP9、MT1-MMP、およびそれらのインヒビターTIMP1、TIMP2が発現する (Sakata Kら、Int J Oncol 2000 Oct; 17 (4): 673-681); MMP1、MMP2、MMP3およびMMP9の各々のレベルおよび総MMP活性は、結腸直腸腫瘍でアップレギュレートし、MMP1が結腸直腸癌進行に最も重要で

ある (Baker EAら、Br J Surg 2000 Sep; 87 (9): 1215-1221); 活性化されたMMP 2が、尿路上皮癌の浸潤に重要な役割を演じ、しかも活性化されたMMP 2発現のレベルが有用な予後指標となる (Kaneda Kら、BJU Int 2000 Sep; 86 (4): 553-557); プロスタグランジン合成のインヒビターが、ヒト前立腺腫瘍細胞浸潤を阻害し、かつMMPの放出を低減する (Attiga FAら、Cancer Res 2000 Aug 15; 60 (16): 4629-37); 血清真性グロブリン画分中のMMP活性が、乳癌および肺癌患者で増加し、これら癌の腫瘍マーカーとして用い得る (Farias Eら、Int J Cancer 2000 Jul 20; 89 (4): 389-94); MMPインヒビターは、腫瘍細胞におけるゼラチン分解活性を阻害する (Ikeda Mら、Clin Cancer Res 2000 Aug; 6 (8): 3290-6); 膜タンパク質LMP1によるMMP 9の誘導が、鼻咽頭癌 (NPC) の転移性に寄与する (Horikawa Tら、Cancer 2000 Aug 15; 89 (4): 715-23); MMPは、血管形成の初期に重要な役割を演じ、MMPインヒビターがヒト微小血管内皮細胞浸潤および形態形成を抑制する (Jia MCら、Adv Exp Med Biol 2000; 476: 181-94); 浸潤性および再発性下垂体腺腫および下垂体癌においてMMP 9が発現する (Turner HEら、J Clin Endocrinol Metab 2000 Aug; 85 (8): 2931-5); など。

MMPはまた、大動脈瘤の進展に関与することが知られている: MMPは、脳動脈瘤形成および破壊に関与する (Gaetani Pら、Neurol Res 1999 Jun; 21 (4): 385-90); MMP-9プロモーターは、脳動脈瘤のリスクファクターである (Peters DGら、Stroke 1999 Dec; 30 (12): 2612-6); MMPの阻害は、動脈瘤モデル

において、小動脈瘤の成長の阻害をもたらす (Treharne GDは、Br J Surg 1999 Aug; 86 (8): 1053-8); など。MMPは、遊走血管平滑筋細胞、マクロファージなどから分泌され、血管壁に存在するコラーゲン、エラスチンなどを破壊し、これによって血管の緊張が失われ、血圧に抵抗しきれずに血管径は拡張する。事実、動脈瘤の血管では、顕著なエラスチンの破壊が認められる。

35才から80才までの成人男性の大動脈径を測定したデータによると、その平均は1.5cm~2.0cmであった。一般に、大動脈径が、平均値の1.5倍を超えると大動脈瘤と判断されるが、上記データによれば、直径3cm以上の瘤を有し、大動脈瘤と判断されるヒトは、400人に1人の割合で存在していた。従って、大動脈破裂の危険度は別にして、35才から80才までの成人男性において大動脈瘤の有病率はかなり高く、65才以上の高齢者においては有病率はさらに大きくなると考えられている。

15

MMPインヒビターは、ラット腹部大動脈瘤モデルにおいて、血管径の拡張を抑制することが報告されている。MMPインヒビターはまた、糸球体腎炎の治療に用いられ得る (Marti HP、Schweiz Med Wochenschr 2000 May 27; 130 (21): 784-8)。しかし、MMPインヒビターの全身投与は、重篤な副作用を生じ、上記種々の疾患の処置 (治療および予防) するための臨床適用は困難である。

「デコイ化合物」cis-エレメントとしての合成ODNは、目的遺伝子のプロモーター領域への核因子の結合をブロックし、インビトロおよびインビボアッセイ系における遺伝子トランス活性化の阻害を生じる (Sullenger、J Virol. 1991 Dec; 65 (12): 6811-6; Morishi

- ta R. ら、Contrib Nephrol. 1996;118:254-64)。このようなデコイ戦略は、ある種のヒト疾患の処置として提案されている。本発明者らは、先に、E2FのデコイODNのトランスフェクションが、再狭窄の遺伝子治療のモデルとして、バルーン損傷後の新内膜形成を阻害したことを報告した (Morishita, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jun 20;92(13):5855-9)。最近、本発明者らは、ラットにおいて、NF- κ Bに対するデコイを用いて、虚血損傷からのインビボ心筋保護に成功した。
- 10 心臓手術の分野において、循環停止は、大動脈動脈瘤変化を有する患者または複合先天的異常を有する新生児における支持技術として一般的に使用される。しかし、循環停止に関する種々の合併症はまだ解決されず、そして循環停止の期間が長くなるにつれ、神経学的後遺症の発生数は高くなる (Jonas RA. J Cardiothorac Vasc Anesth. 1996;10:66-74を参照のこと)。循環停止中、脳を含む全身は、虚血症でそして長い虚血は、ニューロンの壊死を導く。さらに、脳ニューロン、特に海馬におけるニューロンは、数分の虚血でさえ、5日～7日後に死に、この現象は、遅延神経死と呼ばれる (Kirino T. Brain Res. 1982;239:57-69を参照のこと)。超低体温のような技術が、虚血損傷に対して脳を保護するために使用された場合でさえ、45分～60分が、循環停止を維持する肉体的な限界であり、そして超低体温は、種々の危険 (出血の増加、輸血および免疫の低下を含む) と関連する (Kirklin LW, Barratt-Boyes BG, Kirklin JW, Barratt-Boyes BG, 編 Cardiac surgery. New York:Churchill Livingstone; 1993. p. 66-73を参照のこと)。虚血障害由来の神経壊死および遅延神経死の両者に対する脳保護のより良い技術の開発は、大動脈疾患および先天的心
- 15
20
25

臓疾患に対する手術の病的状態を改善することが所望される。

最近の研究により、大脳虚血後の神経損傷におけるNF- κ Bの活性化が明らかになってきており、重要な転写因子であることが判明してきた (Stephenson D, Yin T, Smalstig EB, Hsu MA, Panetta J, Little S.ら、J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20:592-603; Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaninger M., Nat Med. 1999;5:554-9; およびClemens JA, Stephenson DT, Dixon EP, Smalstig EB, Mincy RE, Rash KSら、Brain Res Mol Brain Res. 1997;48:187-96を参照のこと)。

NF- κ Bは、その発現が虚血再灌流損傷に関係する多くの遺伝子の転写活性化剤 (サイトカイン (腫瘍壊死因子 α (TNF- α) およびインターロイキン1 β (IL-1 β)) (Chrisimann JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Intensive Care Med. 1998;24:1131-8を参照のこと) ならびに接着分子 (細胞内接着分子1 (ICAM-1)) (Howard EF, Chen Q, Cheng C, Carroll JE, Hess-D. Neurosci Lett. 1998;248:199-203を参照のこと) など) である。さらに、アスピリンなどのNF- κ Bの阻害剤は、ニューロンにおいて虚血損傷をブロックするようである (Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P. Science. 1996;274:1383-5を参照のこと)。デコイオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) のトランスフェクションは、サイトカインおよび接着分子の

転写活性化をブロックすると報告され (Tomita N, Morishita R, Tomita S, Gibbons GH, Zhang L, Horiuchi Mら、Gene Ther. 2000;7:1326-32を参照のこと)、
本発明者らは、以前、心臓における虚血再灌流損傷を防ぐためのNF- κ Bデ
5 コイODNをトランスフェクトする効力を報告した (Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi Aら、Nat Med. 1997;3:894-9;およびSawa Y, Morishita R, Suzuki K, Kagisaki K, Kaneda Y, Maeda. Kら、Circulation. 1997;9
10 6 (Suppl 9):II-280-5を参照のこと)。

このように、NF- κ Bは、その転写制御下にある、多くの遺伝子の発現を介して、種々の疾患に関与することが示唆されている。しかし、脳虚血に関連する障害または疾患を有効に処置する方法、特に非侵襲的処置法は提供されていない。
15 特に、脳虚血は、上記のように稀ではない疾患であり、高齢化社会にともなう動脈硬化性疾患の増加は、当然大動脈瘤疾患の増加をもたらす。患者の高齢化を考慮した場合、薬剤により大動脈瘤の増長を直接抑制できれば理想的であるが、現在のところその手段はなく、大動脈瘤の低侵襲的な治療および予防法の開発が切望されている。

20

また、大動脈瘤が破裂することなどにより脳が虚血状態に陥ると、脳神経障害を生じる。この障害は、種々の神経における機能不全をもたらし、知能障害、痴呆などをも引き起こし得る。近年になり、NF- κ Bに対するシスエレメント
25 コイオリゴデオキシヌクレオチドが、虚血損傷を媒介する遺伝子の活性化をブロックすることが報告された。しかし、従来は、これらの脳の虚血状態に起因する障害に対する処置または予防のために有効な低侵襲的な治療および予防法は実質

的になかった。

従って、本発明は、NF- κ BデコイODNをニューロンにトランスフェクトすることが、全脳虚血後の神経損傷を防ぎ、そしてNF- κ BデコイODNが、
5 新しい大脳保護治療を提供することを課題とする。本発明は、頸動脈を介してNF- κ BデコイODNを脳にトランスフェクトすることが、ラットモデルにおいて全脳虚血後のニューロンへの損傷を和らげるかどうかを試験することをも課題とする。本発明者らの課題は、心血管手術における循環停止を含む全脳虚血中に使用するための新しい大脳保護薬剤を開発することである。心臓手術における循環
10 停止中の脳保護を改良するために、本発明者らは、全脳虚血後の神経損傷を防ぐ点でNF- κ Bデコイオリゴヌクレオチドの効力を評価することも課題とした。

別の局面では、本発明は、脳への直接投与以外の投与経路で、特に脳血液関門を通過する投与経路を介して、脳へ遺伝子トランスフェクションのための組成物を
15 を投与することにより、脳内での遺伝子トランスフェクションが行わせることを課題とした。このようなことは、従来不可能であった、技術であり、その技術的意義は深い。

発明の要旨

20

本発明により、全体的脳虚血中の頸動脈を介するNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドのラット脳神経への導入が提供される。ポリメラーゼ連鎖反応は、トランスフェクトされたNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドが、
全体的脳虚血後1時間で効果的に腫瘍壊死因子 α 、インターロイキン1 β 、および細胞内接着分子1 (ICAM-1) メッセンジャーRNAの発現を阻害する
25 ことを示した。末端デオキリヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介デオキシウ

リジン三リン酸ニック末端標識染色および微小管結合タンパク質2 (MAP-2) 免疫組織化学は、トランスフェクトされたNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドが、全体的脳虚血後7日で、有意に神経損傷を和らげることを示した。脳虚血中のNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドの治療的トランスフェクションは、神経損傷を和らげるために有効であり得、全体的虚血に対する大脳保護の戦略を示唆する。

本発明は、脳の虚血状態を伴う疾患および障害ならびに該疾患および障害に起因する障害を治療および予防するための薬学的組成物であって、少なくとも1つのNF- κ Bのデコイ、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物を提供する。本発明はまた、脳の虚血状態を伴う疾患および障害ならびに上記疾患および障害に起因する障害を治療および予防するための方法であって、少なくとも1つのNF- κ Bのデコイ、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物を被検体に投与する工程、を包含する、方法を提供する。

15

1つの実施形態では、上記疾患は、クモ膜下出血、高血圧性脳内出血、脳梗塞、脳虚血、脳腫瘍、頭部外傷、慢性硬膜下血腫および急性硬膜下血腫からなる群より選択される少なくとも1つの疾患であり得る。上記脳の虚血状態を伴う疾患および障害に起因する疾患および障害は、神経障害、運動障害、知能障害、痴呆、半身麻痺、頭痛および尿失禁からなる群より選択され得る。上記薬学的に受容可能なキャリアがリポソームであり得る。上記NF- κ Bのデコイは、配列GGATT T T C C Cを含む得る。本発明の組成物は、頸動脈を介する投与経路に適切であり得る。

25 別の局面において、本発明は、脳への直接投与以外の経路により、脳での遺伝子トランスフェクションを行うための組成物であって、少なくとも1つのデコイ、

および薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物を提供する。本発明はまた、脳への直接投与以外の経路により、脳での遺伝子トランスフェクションを行う方法であって、少なくとも1つのデコイ、および薬学的に受容可能なキャリアを、脳への直接投与以外の経路に適切な形態で含む、組成物、を被検体に投与する工程を包含する、方法を提供する。

1つの実施形態において、上記脳への直接投与以外の経路は、頸動脈注入であり得る。別の実施形態において、上記デコイは、NF- κ Bであり得る。別の実施形態において、上記薬学的に受容可能なキャリアはリポソームであり得る。

10

図面の簡単な説明

図1は、再灌流後1時間でのFITCで標識したNF- κ BデコイODNでトランスフェクトしたラット組織の顕微鏡写真を示す。FITC蛍光が全体に観察され、そして脳全体のニューロン中の核内で観察することができた。Aはラット皮質切片、Bは海馬を表す。A-1およびB-1は、40倍での写真を示し、A-2およびB-2は、100倍での写真を示す。

15

図2は、再灌流後1時間でのラット海馬でのmRNAの誘導率を示すグラフである。これらのmRNAのレベルは、各々のサンプルにおけるGAPDHのmRNAレベルに対して正規化した。誘導率は、正常ラット海馬でのレベルと本発明での処置されたもののレベルを比較することによって算出した。AはTNF- α mRNAを示し、BはIL-1 β mRNAを示し、CはICAM-1 mRNAを示す。すべての値は、NF- κ Bデコイ群において、Sデコイ群よりも有意に抑制されていた。

20

25

図3Aは、全脳虚血後7日でのTUNEL染色を伴うラット海馬CA1領域を

貫く切片を示す写真である。NF- κ BデコイODN治療（A-1）は、Sデコイ群（A-2）と比較して、TUNEL陽性ニューロン（茶色に染まる）の出現を抑制した。倍率は、A-1およびA-2とも100倍である。図3Bは、海馬CA1領域でのTUNEL陽性ニューロンの割合を示すグラフである（500 μ m長）。TUNEL陽性ニューロンの割合は、Sデコイ群（ $p < 0.01$ ）よりも、NF- κ Bデコイ群において、有意に減少していた。

図4Aは、全脳虚血後7日でのMAP2免疫染色を伴うラット海馬CA1領域を貫く切片を示す写真である。NF- κ BデコイODN治療（A-1）は、Sデコイ群（A-2）と比較して、MAP2陽性ニューロン（細胞質ゾルにおける免疫反応なし）の出現を抑制した。倍率は、A-1およびA-2とも100倍である。図4Bは、海馬CA1領域でのMAP2陽性ニューロンの割合を示すグラフである（500 μ m長）。MAP2陽性ニューロンの割合は、Sデコイ群（ $p < 0.01$ ）よりも、NF- κ Bデコイ群において、有意に維持されていた。

15

発明の実施の形態

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など、独語の場合の「ein」、「der」、「das」、「die」などおよびその格変化形、仏語の場合の「un」、「une」、「le」、「la」など、スペイン語における「un」、「una」、「el」、「la」など、他の言語における対応する冠詞、形容詞など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

25

本発明で用いられる用語「デコイ」または「デコイ化合物」は、NF- κ Bなどの転写因子が結合する染色体上の部位、またはNF- κ Bなどの転写因子に制御される遺伝子の他の転写調節因子が結合する染色体上の部位（以下標的結合部位という）に結合し、NF- κ Bまたはその他の転写因子と、これらの標的結合部位への結合について拮抗する化合物をいう。代表的には、デコイまたはデコイ化合物は、核酸およびその類似体である。

デコイが核内に存在する場合、転写調節因子の標的結合部位への結合について、デコイが転写調節因子と競合し、その結果、転写調節因子の標的結合部位への結合によってもたらされる生物学的機能が阻害される。デコイは、標的結合配列に結合し得る核酸配列を少なくとも1つ含む。標的結合配列への結合活性を有する限り、デコイは、本発明の薬学的組成物の調製に用いることができる。

デコイの例としては、NF- κ BについてGGGATTTCを含むオリゴヌクレオチドが挙げられる。好ましいデコイの例として、5'-CCTTGAAGGGATTTCCTCC-3'（配列番号1）（NF- κ Bデコイ）、5'-GATCTAGGGATTTCGGGAAATGAAGCT-3'（配列番号2）（STAT-1のデコイ）、5'-AGCTTGAGATAGAGCT-3'（配列番号3）（GATA-3のデコイ）、5'-GATCAAGACCTTTTCCCAAGAAATCTAT-3'（配列番号4）（STAT-6のデコイ）、5'-AGCTTGAGTCAGAAGCT-3'（配列番号5）（AP-1のデコイ）、および5'-AATTCACCGGAAGTATTCGA-3'（配列番号6）（Etsのデコイ）、5'-TGACGTCA-3'（CREデコイ配列）またはこれらの相補体を含むオリゴヌクレオチド、これらの変異体、またはこれらを分子内に含む化合物が挙げられる。オリゴヌクレオチドは、DNAでもRNAでもよく、またはそのオリゴヌクレオチド内に核酸修飾体および／または擬核酸を含

むものであってもよい。また、これらのオリゴヌクレオチド、その変異体、またはこれらを分子内に含む化合物は、1本鎖でも2本鎖であってもよく、線状であっても環状であってもよい。変異体とは上記配列の一部が、変異、置換、挿入、欠失しているもので、NF- κ Bなどの転写因子またはNF- κ Bなどの転写因子に制御される遺伝子のその他の転写調節因子が結合する核酸結合部位と特異的に拮抗する核酸を示す。さらに好ましいNF- κ Bなどの転写因子またはNF- κ Bなどの転写因子に制御される遺伝子のその他の転写調節因子のデコイとしては、上記核酸配列を1つまたは複数含む2本鎖オリゴヌクレオチドまたはその変異体が挙げられる。上記核酸配列を1つまたは複数含む核酸は、含まれる核酸配列の数
10 数を示すために、含まれる核酸配列が2つの場合ダブルデコイと称され、そして3つの場合トリプルデコイなどと称され得る。

本発明で用いられるオリゴヌクレオチドは、リン酸ジエステル結合部の酸素原子をイオウ原子で置換したチオリン酸ジエステル結合をもつオリゴヌクレオチド
15 (S-オリゴ)、またはリン酸ジエステル結合を電荷をもたないメチルホスフェート基で置換したオリゴヌクレオチド等、生体内でオリゴヌクレオチドが分解を受けにくくするために改変したオリゴヌクレオチド等が含まれる。

本発明で用いられるデコイの製造方法としては、当該分野で公知の化学合成法
20 または生化学的合成法を用いることができる。例えば、デコイ化合物として核酸を用いる場合、遺伝子工学で一般的に用いられる核酸合成法を用いることができ、例えば、DNA合成装置を用いて目的のデコイ核酸を直接合成してもよいし、またはこれらの核酸、それを含む核酸またはその一部を合成した後、PCR法またはクローニングベクター等を用いて増幅してもよい。さらに、これらの方法により
25 り得られた核酸を、制限酵素等を用いて切断し、DNAリガーゼ等を用いて結合等を行い、目的とする核酸を製造してもよい。また、さらに細胞内でより安定な

デコイ核酸を得るために、核酸の塩基、糖、リン酸部分に、例えば、アルキル化、アシル化等の化学修飾を施してもよい。

本発明は、上記のデコイ化合物を単独で、または安定化化合物、希釈剤、担体、
5 または別の成分または薬剤のような他の薬剤と組み合わせて含む薬学的組成物を提供する。

本発明の薬学的組成物は、デコイが患部の細胞内または目的とする組織の細胞内に取り込まれるような形態で用いられ得る。

10

本発明の薬学的組成物は、任意の無菌生体適合性薬学的キャリアー（生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、および水を含むが、それらに限定されない）中で投与され得る。これらの分子のいずれも、適切な賦形剤、アジュバント、および／または薬学的に受容可能なキャリアーと混合する薬学的組成物中
15 て、単独で、あるいは他の薬剤と組み合わせて患者に投与され得る。本発明の実施態様において、薬学的に受容可能なキャリアーは薬学的に不活性である。

本発明の薬学的組成物の投与は、経口または非経口により達成される。非経口送達の方法としては、局所、動脈内（例えば、頸動脈を介する）、筋肉内、皮下、
20 髄内、クモ膜下腔内、脳室内、静脈内、腹腔内、または鼻孔内の投与が挙げられる。本発明は、処置部位である脳に到達する経路であれば、どのような経路でもよい。本発明では、脳血液関門を越える必要がある頸部注入などでも有効であることが証明されたことから、従来技術では達成されなかった格別の効果を有する。従って、好ましい実施形態では、本発明は、脳血液関門を通過する必要がある経
25 路（例えば、経口投与、頭部以外の非経口投与（例えば、頸部投与））で投与される。より好ましくは、投与経路は、頸部注入（例えば、頸動脈を介する）であり

得る。従って、頸動脈を介した経路で、脳における遺伝子トランスフェクションを行うための新たな処置方法およびそのための組成物が本発明により提供される。

デコイ化合物に加えて、これらの薬学的組成物は、賦形剤または薬学的に使用
5 できる製剤を調製するために、デコイ化合物のプロセッシングを促進する他の化合物を含む、適切な、薬学的に受容可能なキャリアーを含み得る。処方および投与のための技術のさらなる詳細は、例えば、日本薬局方の最新版および最新追補、「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES」
(Maack Publishing Co., Easton, PA)の最終
10 版に記載されている。

経口投与のための薬学的組成物は、投与に適した投与形において当該分野で周知の薬学的に受容可能なキャリアを用いて処方され得る。このようなキャリアは、
15 ゲル、シロップ、スラリー、懸濁物などに処方されることを可能とする。

経口使用のための薬学的組成物は、活性化合物を固体賦形剤と組合せ、所望により得られた混合物を粉砕し、所望ならば、錠剤または糖衣剤のコアを得るために、適切なさらなる化合物を添加した後、顆粒の混合物をプロセッシングすること
20 を介して得られ得る。適切な賦形剤は炭水化物またはタンパク質充填剤であり、以下を含むが、それらに限定されない：ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖；トウモロコシ、コムギ、イネ、ジャガイモ、または他の植物由来のデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース；な
25 らびにアラビアゴムおよびトラガcantゴムを含むゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質。所望ならば、架橋されたポリビニルピロリド

ン、寒天、アルギン酸またはその塩（例えば、アルギン酸ナトリウム）のような崩壊剤または可溶化剤が添加され得る。

糖衣剤コアは、濃縮糖溶液のような適切なコーティングとともに提供される。

- 5 これはまた、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボルゲル、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラツカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合液をも含有し得る。製品同定のため、または活性化化合物の量（すなわち用量）を特徴付けるために、染料または色素が錠剤または糖衣剤に添加され得る。

10

- 経口で使用され得る薬学的製剤は、例えば、ゼラチンカプセル、ゼラチンおよびコーティング（例えば、グリセロールまたはソルビトール）よりなるソフト封着カプセルを含む。ゼラチンカプセルは、ラクトースまたは澱粉のような充填剤またはバインダー、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、および所望により安定化剤と混合した活性な成分を含有し得る。ソフトカプセルでは、デコイ化合物は、安定化剤とともにまたはともなわずに、脂肪油、流動パラフィンまたは液状ポリエチレングリコールのような適切な液体に溶解または懸濁され得る。

- 20 非経口投与用の薬学的製剤は活性化合物の水溶液を含む。注射のために、本発明の薬学的組成物は水溶液、好ましくはハンクスの溶液、リンゲル溶液、または緩衝化生理食塩水のような生理学的に適合する緩衝液中に処方され得る。水性注射懸濁物は、懸濁物の粘度を増加させる物質（例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストラン）を含有し得る。さらに、
- 25 活性化合物の懸濁物は、適切な油状注射懸濁物として調製され得る。適切な親油性溶媒またはビヒクルは、ゴマ油のような脂肪酸、あるいはオレイン酸エチルま

たはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームを含む。所望により、懸濁物は、高濃度溶液の製剤を可能にする安定化剤または化合物の溶解度を増加させる適切な薬剤または試薬を含有し得る。

- 5 局所または鼻孔投与のために、浸透されるべき特定のバリアに対して適切な浸透剤が製剤中で使用される。このような浸透剤は一般に当該分野で公知である。

- 本発明の薬学的組成物は、当該分野で公知の様式と同様の様式（例えば、従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣剤作製、水簸、乳化、カプセル化、包括、または
10 凍結乾燥の手段によって）で製造され得る。

- 好ましくは、患部の細胞または目的とする組織の細胞内に局所投与または頸部注入のように非経口的投与をする場合、本発明の薬学的組成物は、キャリアとして合成または天然の親水性ポリマーを含み有る。このような親水性ポリマーの例
15 として、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリエチレングリコールが挙げられる。本発明のデコイ化合物を、適切な溶媒中のこのような親水性ポリマーと混合し、溶媒を、風乾などの方法により除去して、所望の形態、例えば、シート状に成型した後、標的部位に付与し得る。このような親水性ポリマーを含む製剤は、水分含量が少ないので、保存性に優れ、使用の際には、水分を吸収してゲル状になる
20 ので、デコイ化合物の貯留性に優れる。

- あるいは、デコイとして核酸またはその修飾体を用いる場合には、本発明の薬学的組成物は、一般に用いられている遺伝子導入法で用いられる形態、例えば、センダイウイルス（H V J）等を用いた膜融合リポソーム製剤や、エンドサイトーシスを利用するリポソーム製剤等のリポソーム製剤、リポフェクトアミン（G
25 i o c o B R L）等のカチオン性脂質を含有する製剤、またはレトロウイルス

ベクター、アデノウイルスベクター等を用いるウイルス製剤を用いるのが有利であり、特に、膜融合リポソーム製剤が好適である。

リポソーム製剤は、そのリポソーム構造体が、大きな1枚膜リポソーム (LUV)、
5 V)、多重膜リポソーム (MLV)、小さな一枚膜リポソーム (SUV) のいずれ
であってもよい。その大きさも、LUVでは200から1000 nm、MLVで
は400～3500 nm、SUVでは20～50 nm程度の粒子系をとり得るが、
HVJ等を用いる膜融合リポソーム製剤の場合は粒子系200～1000 nmの
MLVを用いるのが好ましい。

10

リポソームの製造方法は、デコイが保持されるものであれば特に限定されるも
のではなく、慣用の方法、例えば、逆相蒸発法 (S z o k a、F ら、B i o c h
i m. B i o p h y s. A c t a、V o l. 6 0 1 5 5 9 (1980))、エー
テル注入法 (D e a m e r、D. W. : A n n. N. Y. A c a d. S c i., V
15 o l. 3 0 8 2 5 0 (1978))、界面活性剤法 (B r u n n e r、J ら : B
i o c h i m. B i o p h y s. A c t a、V o l. 4 5 5 3 2 2 (1976))
等を用いて製造することができる。

リポソーム構造を形成するための脂質としては、リン脂質、コレステロール類
20 や窒素脂質等が用いられるが、一般に、リン脂質が好適であり、ホスファチジル
コリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジル
イノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、カルジオ
リピン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチン等の
天然リン脂質、あるいはこれらを定法に従って水素添加したものの他、ジセチル
25 ホスフェート、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファ
チジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイ

ルホスファチジルセリン、エレオステアロイルホスファチジルコリン、エレオステアロイルホスファチジルエタノールアミン、エレオステアロイルホスファチジルセリン等の合成リン脂質を用いることができる。

- 5 これらのリン脂質を含む脂質類は単独で用いることができるが、2種以上を併用することも可能である。このとき、エタノールアミンやコリン等の陽性基をもつ原子団を分子内にもつものを用いることにより、電氣的に陰性のデコイ核酸の結合率を増加させることもできる。これらリポソーム形成時の主要リン脂質の他に一般にリポソーム形成用添加剤として知られるコレステロール類、ステアリル
- 10 アミン、 α -トコフェロール等の添加剤を用いることもできる。

- このようにして得られるリポソームには、患部の細胞または目的とする組織の細胞内への取り込みを促進するために、膜融合促進物質、例えば、HVJ、不活化HVJ、センダウイルスから精製された膜融合促進タンパク質、ポリエチレン
- 15 グルコール等を添加することができる。

- リポソーム製剤の製造法の例を具体的に説明すると、例えば、前記したリポソーム形成物質を、コレステロールとともにテトラヒドロフラン、クロロホルム、エタノール等の有機溶媒に溶解し、これを適切な容器に入れて減圧下に溶媒を留
- 20 去して容器内面にリポソーム形成物質の膜を形成する。これにデコイを含有する緩衝液を加えて攪拌し、得られたリポソームにさらに所望により前記の膜融合促進物質を添加した後、リポソームを単離する。このようにして得られるデコイを含有するリポソームは適当な溶媒中に懸濁させるか、または一旦凍結乾燥したものを、適当な溶媒に再分散させて治療に用いることができる。膜融合促進物質は
- 25 リポソーム単離後、使用までの間に添加してもよい。

本発明の組成物またはキットはまた、さらに生体親和性材料を含み得る。この生体親和性材料は、例えば、シリコーン、コラーゲン、ゼラチン、グリコール酸・乳酸の共重合体、エチレンビニル酢酸共重合体、ポリウレタン、ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、ポリアクリレート、ポリメタクリレートからなる群より選択される少なくとも1つを含み得る。成型が容易であることからシリコーンが好ましい。生分解性高分子の例としては、コラーゲン、ゼラチン、 α -ヒドロキシカルボン酸類（例えば、グリコール酸、乳酸、ヒドロキシ酪酸など）、ヒドロキシジカルボン酸類（例えば、リンゴ酸など）およびヒドロキシトリカルボン酸（例えば、クエン酸など）からなる群より選択される1種以上から無触媒脱水重縮合により合成された重合体、共重合体またはこれらの混合物、ポリ- α -シアノアクリル酸エステル、ポリアミノ酸（例えば、ポリ- γ -ベンジル-L-グルタミン酸など）、無水マレイン酸系共重合体（例えば、スチレン-マレイン酸共重合体など）のポリ酸無水物などが挙げられる。重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトのいずれでもよく、 α -ヒドロキシカルボン酸類、ヒドロキシジカルボン酸類、ヒドロキシトリカルボン酸類が分子内に光学活性中心を有する場合、D-体、L-体、DL-体のいずれでも用いることが可能である。好ましくは、グリコール酸・乳酸の共重合体を使用され得る。

1つの実施形態において、本発明の組成物またはキットは、徐放性形態で提供され得る。徐放性形態の剤型は、本発明において使用され得る限り、当該分野で公知の任意の形態であり得る。そのような形態としては、例えば、ロッド状（ペレット状、シリンダー状、針状など）、錠剤形態、ディスク状、球状、シート状のような製剤であり得る。徐放性形態を調製する方法は、当該分野において公知であり、例えば、日本薬局方、米国薬局方および他の国の薬局方などに記載されている。徐放剤（持続性投与剤）を製造する方法としては、例えば、複合体から薬物の解離を利用する方法、水性懸濁注射液とする方法、油性注射液または油性懸

濁注射液とする方法、乳濁製注射液（o/w型、w/o型の乳濁製注射液など）とする方法などが挙げられる。

- 5 徐放性形態の場合、徐放性製剤（ミニペレット製剤など）を投与部位付近に埋め込むこともできる。または、徐放性製剤は、オスモチックポンプなどを用いて投与部位に連続的に徐々に投与することもできる。

- 10 注射剤は当該分野において周知の方法により調製することができる。例えば、適切な溶剤（生理食塩水、PBSのような緩衝液、滅菌水など）に溶解した後、フィルターなどで濾過滅菌し、次いで無菌容器（例えば、アンプルなど）に充填することにより注射剤を調製することができる。この注射剤には、必要に応じて、慣用の薬学的キャリアを含めてもよい。リポソーム形態の場合には、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤のようなリポソーム製剤に必要な試薬を加えることができる。リポソームは、非経口的に投与することが好ましい。従って、リポソームを投与する場合には、非侵襲的なカテーテルまたは非侵襲的な注射器などによ
- 15 る投与方法を用いることができる。非侵襲的なカテーテルを用いる投与方法としては、例えば、脳内に直接または頸動脈に本発明の組成物を注入することが挙げられる。

- 20 本発明の薬学的組成物は、デコイ化合物が意図される目的を達成するのに有効な量で含有される組成物を含む。「治療的有效量」または「薬理学的有効量」は当業者に十分に認識される用語であり、意図される薬理学的結果を生じるために有効な薬剤の量をいう。従って、治療的有效量は、処置されるべき疾患の徴候を軽減するのに十分な量である。所定の適用のための有効量（例えば、治療的有效量）
- 25 を確認する1つの有用なアッセイは、標的疾患の回復の程度を測定することである。実際に投与される量は、処置が適用されるべき個体に依存し、好ましくは、

所望の効果が顕著な副作用をともなうことなく達成されるように最適化された量である。治療的有效用量の決定は十分に当業者の能力内にある。

- 5 いずれの化合物についても、治療的有效用量は、細胞培養アッセイまたは任意の適切な動物モデルのいずれかにおいて、最初に見積もられ得る。動物モデルはまた、所望の濃度範囲および投与経路を達成するために用いられる。次いで、このような情報を用いて、ヒトにおける投与に有用な用量および経路を決定することができる。
- 10 治療的有效量とは、疾患の徴候または状態を軽減するデコイ化合物の量をいう。このような化合物の治療効果および毒性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順（例えば、 ED_{50} 、集団の 50% において治療的に有効な用量；および LD_{50} 、集団の 50% に対して致死性である用量）によって決定され得る。治療効果と毒性効果との間の用量比は治療係数であり、それは比率 ED_{50}/LD_{50} として表
- 15 され得る。大きな治療係数を呈する薬学的組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータが、ヒトでの使用のための量の範囲を公式化するのに使用される。このような化合物の用量は、好ましくは、毒性をほとんどまたは全くともなわない ED_{50} を含む循環濃度の範囲内にある。この用量は、使用される投与形態、患者の感受性、および投与経路に依存してこの範囲内で変化する。
- 20 一例として、デコイの投与量は、年齢その他の患者の条件、疾患の種類、使用するデコイの種類等により適宜選択されるが、例えば、脳への投与では、一般に、1 回あたり、 $10 \sim 10,000 \text{ nmol}$ を 1 日 1 回から数回投与することができる。また、頸動脈への投与では、一般に、1 回あたり、 $10 \sim 10,000 \text{ nmol}$ を 1 日 1 回から数回投与することができる。

25

正確な用量は、治療されるべき患者を考慮して、個々の臨床医によって選択さ

れる。用量および投与は、十分なレベルの活性部分を提供するか、または所望の効果を維持するように調整される。考慮され得るさらなる因子としては、疾患状態の重症度（例えば、腫瘍のサイズおよび位置；患者の年齢、体重、および性別；投与の食餌制限時間、および頻度、薬物組合せ、反応感受性、および治療に対する耐性／応答）が挙げられる。特定の製剤の半減期およびクリアランス速度に応じて、持続作用性薬学的組成物は、3～4日毎に、毎週、または2週間に1回、投与され得る。特定の用量および送達の方法に関するガイダンスは当該分野で公知の文献に提供されている。

10 この様にして得られたデコイを主成分として含有する医薬品は、疾患の種類、使用するデコイの種類等により各種の方法で投与することができ、例えば、虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患および癌の転移・浸潤、悪疫質においては血管内投与、疾患部位に塗布、疾患部位内に投与または疾患部位に血管内投与等することができる。さらに具体的な例としては、例えば、臓器梗塞等でPTCAを行う場合には、同時またはその前後に患部血管に投与することができ、また臓器移植等では移植する臓器を予め本願で用いられる製剤で処置して用いてもよい。また、例えば、慢性関節リウマチ等では、直接関節内に注入して用いることもできる。例えば、脳では、脳内に直接注入して用いることもできる。

20 本発明の化合物が対象とする障害または疾患は、脳内の血管が破裂したことなどにより、脳内の血液が不足していることに起因するものであり、本明細書において、脳の虚血状態を伴う疾患という。そのような障害または疾患としては、例えば、クモ膜下出血、一過性脳虚血、脳動脈硬化症のような脳卒中、高血圧性脳内出血、脳梗塞、脳虚血、脳腫瘍における血管破裂、頭部外傷、慢性、急性の硬
25 膜下血腫、脳血管閉塞、脳血栓、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症、脳梗塞後遺症などが挙げられる。本発明はまた、

上記のような脳の虚血状態を伴う疾患に起因する障害または後遺症（例えば、神経障害など）を処置および予防するのに有効である。

「クモ膜下出血」とは、クモ膜下腔に出血した状態をいう。頭部外傷によるクモ膜下出血を除けば、脳動脈瘤破裂によるものが最大の原因である（60? 80%）。その他の原因としては、脳動静脈奇形破裂（10%）、高血圧性脳内出血（10%）、その他の順となっている。高血圧性脳内出血の場合は、出血が脳室内に穿破し、これがクモ膜下腔に流出したと考えられる。クモ膜下腔閉塞による慢性的な髄液循環障害が約10%に生じ、正常圧水頭症を引き起こし得る。従来は、その症状で
5 ある歩行障害、尿失禁、知能障害が髄液シャント術によって回復していたが、約30%の患者は、入院前に死亡する。他の従来の治療としては、動脈瘤をチタン製のクリップでつまんで、再び出血を防ぐ方法、および太股の動脈から細い管を入れて、チタン製のコイルで動脈瘤を内側からつめる方法などがある。このようにクモ膜下出血の処置は外科的処置が多く根本的な解決には至っていない。本発明
10 は、これらすべてのクモ膜下出血の処置および予防に有効であり得る

高血圧性脳内出血とは、長期に持続する高血圧のために脳の細小動脈壁に類線維性壊死が起こり、壁が破綻し出血する状態をいう。脳血管障害の20%を占める。高血圧性脳内出血はまた、微小脳動脈瘤が発生し、それが破綻して発生するとも
20 いわれている。高発生年齢は60歳代であり、出血の発生部位は大腦基底核視床部60%、大腦皮質下20%、小脳10%、中脳橋10%となっている。従来は、保存的治療がなされ、出血の拡大防止、頭蓋内圧低下、全身合併症の防止、早期リハビリに向けられている。外科的治療の目的は主に救命である。長期治療成績は手術例と非手術例との間では違いがなかったという報告もあり、手術に代わる有効な
25 処置および予防方法が期待されていた。本発明は、これらすべての高血圧性脳内出血の処置および予防に有効であり得る。

脳梗塞とは、完全に血管がつまってしまい、脳の一部分が死んでしまう状態をいう。脳虚血とは、血管が狭くなって十分な血液が脳に供給されない状態をいう。脳 100 g あたり一分間に 20 ml 以上の血液が供給されなければ、脳の機能が障害されるといわれる。脳梗塞による症状は、半身の麻痺や感覚障害です。早朝に発生することが多く、心臓に不整脈などの障害がある場合に起きやすい。現在の最もよく行われる方法は、血管がつまってから、できるだけ早期（好ましくは、発症から 3 時間以内）に行う血栓溶解である。発症から 3 時間以上経過してしまうと、血栓溶解により出血が起ることがあるからである（この状態を出血性梗塞とよび、極めて危険な状態である）。最近では、MRI、DWI によって早期に梗塞を発見することが行われている。しかし、脳虚血における根本的な治療はこれまでは実質的にはなかった。本発明は、これらすべての脳虚血および脳梗塞の処置および予防に有効であり得る。

脳腫瘍とは、本明細書において、頭蓋内に発生する腫瘍をいう。脳実質のみならず、頭蓋内に存在する組織（例えば、骨、髄膜、血管、下垂体、脳神経、先天性遺残組織などを含む）から発生する原発性または転移性新生物をさす。寄生虫、結核などの肉芽腫も脳腫瘍に含まれ得る。脳腫瘍は、通常 WHO の国際統一分類により分類されており、神経膠腫、髄膜腫、下垂体腺腫、神経鞘腫などがある。基本的に手術による腫瘍摘除により処置されている。また、腫瘍の局在部位により根治手術が困難な場合は、放射線療法、化学療法、免疫療法が用いられている。従って、本発明のデコイによる処置は、新たな局面による有効な治療および予防の方法を提供する。

頭部外傷とは、頭部に外力が作用したために生じたあらゆる損傷をいう。発生の時期により、急性期（外傷より 3 日以内）、亜急性期（外傷より 4? 20 日くらい

まで)、慢性期(外傷より3週以降)の3期に分かれ、この区別は予後に関係する。頭部外傷は、交通事故、転落、転倒などにより頭部を打撲した場合などに発生する。頭部外傷には、全く異常が見られないものから脳挫傷・脳内血腫をともなうものまで種々存在する。頭部外傷の分類には種々あるが、一般的には開放性と閉鎖性に分けられ、さらに部位により頭皮、頭蓋骨、頭蓋内に分けられる。本発明は、これらすべての頭部外傷による脳の血管破裂の処置および予防に有効であり得る。

硬膜下血腫とは、硬膜と脳表との間に形成される被膜を有する流動性の血腫をいう。硬膜下血腫は、急性のものと慢性のものとの分類される。急性硬膜下血腫は、外傷によって生ずる脳と頭蓋骨とのずれによって伸展された橋静脈が断裂することによって起こる場合と、外傷によって生じた脳挫傷*からの出血が硬膜下腔に広がってできる場合とがある。慢性硬膜下血腫とは、外傷によって生じた比較的少量の硬膜下血腫が数週間から数ヵ月の経過のうちに次第に増大し、意識低下や、精神症状、あるいは運動麻痺をきたす病態をいう。硬膜下血腫の周囲に、次第に生体反応としての線維性の被膜が形成され、この膜が半透膜の性質を有し、次第に周囲の髄液成分が引き込まれ増大する。半身麻痺、頭痛などの症状に始まり、痴呆、歩行障害、尿失禁などの典型的な症状が発生し得る。局所麻酔の手術によって、血液をく方法、および脳室と腹部をチューブによって連絡させる脳室-腹腔短絡術などにより処置されている。本発明は、これらすべての硬膜下血腫の処置および予防に有効であり得る。

従って、本明細書において、脳の虚血状態を伴う疾患および障害に起因する疾患および障害は、神経障害、運動障害、知能障害、痴呆、半身麻痺、頭痛および尿失禁からなる群より選択され得る。

本発明が対象とする治療部位は、どのような種類の生物由来であり得る。本発明が対象とする生物としては、脊椎動物または無脊椎動物が挙げられる。好ましくは、本発明が対象とする生物は、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）である。より好ましくは、本発明が対象とする生物は、霊長類である。最も好ましくは、本発明はヒトを対象とする。

本発明の組成物およびキットは、通常は医師の監督のもとで実施されるが、その国の監督官庁および法律が許容する場合は、医師の監督なしに実施することができる。

10

別の局面において、本発明は、脳虚血障害を処置するためのキットを提供する。このキットは、本発明のデコイまたはデコイ化合物；ならびにこのデコイまたはデコイ化合物を投与する指針を与える指示書を備える。ここで、上記指示書は、デコイまたはデコイ化合物の適切な投与方法を指示する文言が記載されている。

この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

20

本発明の方法において使用されるデコイまたはデコイ化合物の量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、被験体の年齢、体重、性別、既往歴、細胞生理活性物質の形態または種類、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。

25

本発明の方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日－数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回－1ヶ月に1回）の投与が挙げられる。1週間－1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

別の実施形態では、本発明の処置方法は、さらに他の薬剤もまた投与する工程を包含し得る。そのような薬剤は、当該分野において公知の任意の医薬であり得、例えば、そのような薬剤は、薬学において公知の任意の薬剤（例えば、抗生物質など）であり得る。当然、そのような薬剤は、2種類以上の他の薬剤であり得る。そのような薬剤としては、例えば、日本薬局方最新版、米国薬局方最新版、他の国の薬局方の最新版において掲載されているものなどが挙げられる。そのような薬剤は、好ましくは、脳虚血疾患に対して効果を有するもの（例えば、抗血小板剤、脳神経機能改善剤、脳代謝改善剤、血流改善剤など）であり得る。

15

好ましい実施形態において、本発明のデコイまたはデコイ化合物は、少なくとも0.1 ng/ml存在し得る。より好ましくは、本発明のデコイまたはデコイ化合物は、1.0 ng/mlで存在し得る。別の好ましい実施形態では、本発明のデコイまたはデコイ化合物は、少なくとも2.0 ng/ml、少なくとも5.0 ng/ml、少なくとも5.0 ng/ml、少なくとも20.0 ng/ml、少なくとも50.0 ng/ml、少なくとも100.0 ng/ml、少なくとも200.0 ng/ml、少なくとも500.0 ng/ml、少なくとも1.0 µg/ml、少なくとも2.0 µg/ml、少なくとも2.0 µg/ml、少なくとも10.0 µg/ml、少なくとも100.0 µg/mlまたは少なくとも1mg/mlを超えて存在し得る。

20

25

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F.M.A. ら編 (1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY；Sambrook J ら (1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。

本明細書において、「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、特に言及する場合を除き互換的に用いられ、一連のヌクレオチドからなる高分子（重合体）をいう。ヌクレオチドとは、部分がリン酸エステルになっているヌクレオシドをいう。塩基部分としては、ピリミジン塩基またはプリン塩基のヌクレオチド（ピリミジンヌクレオチドおよびプリンヌクレオチド）がある。ポリヌクレオチドとしては、DNAまたはRNAが挙げられる。

また、ヒトゲノムプロジェクトのようなゲノムデータ、GenBankのような遺伝子情報データベースに対して、本発明のデコイの配列をもとにBLASTのようなソフトウェアを用いて相同性検索を行って得られた配列もまた、本発明の範囲内にある。

本明細書では塩基配列の同一性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。

本明細書において、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) などの実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。

20

遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、またはストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも

25

70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。

5 本明細書において、核酸分子の「断片（フラグメント）」とは、参照核酸分子の全長よりも短く、本発明の因子としての使用に十分な長さを有するポリヌクレオチドをいう。したがって、本明細書におけるフラグメントは、全長のポリヌクレオチド（長さが n ）に対して、 $1 \sim n-1$ までの配列長さを有するポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、
10 8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。

15 「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、配列番号1のDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは9
20 5%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。記載の相同性は、たとえばAltschulら（J. Mol. Biol. 215, 403-410（1990））が開発したアルゴリズムを使用した検索プログラムBLASTを用いることにより、scoreで類似度が示される。

25 「誘導体オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドをいう。そのような

オリゴヌクレオチドとして具体的には、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC - 5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC - 5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC - 5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2' - O - プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能を発揮する活性が包含される。例えば、ある因子が転写因子である場合、転写活性を調節する活性を包含する。ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。本発明の1実施形態では、その生物学的活性は、転写因子の少なくとも1つへの結合活性を包含する。

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体ヌクレオチド」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとの

ヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドは、当該分野において周知である。

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮 (truncated) 改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。対立遺伝子 (allele) とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。本明細書において、核酸分子の「ホモログ (種相同体)」とは、参照核酸分子のヌクレオチド配列と相同性を有するヌクレオチド配列を有する核酸分子をいう。ホモログは、代表的には、参照核酸分子と、ストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドをいう。本発明の核酸分子についていう場合、「ホモログ」とは、本発明のデコイの核酸配列と相同性を有する核酸配列を有する核酸分子であって、その生物学的機能が本発明のプロモーターと同一または類似する核酸分子をいう。従って、「ホモログ」と「改変体」とは一部重複する概念である。従って、ホモログは、ある種の中で、ある配列とヌクレオチドレベルで、相同性 (好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性) を有するものをいう。そのようなホモログを取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。例えば、本発明のデコイのホモログは、同じ種の相同遺伝子または他の種の対応する遺伝子であり得る。従って、本発明のデコイには、すべてのデコイのホモログが包含され得る。

25 (発明の詳細な説明)

本発明は、第一の局面において、脳の虚血状態を伴う疾患および障害ならびに

該疾患および障害に起因する障害を治療および予防するための薬学的組成物およびこの組成物を使用した脳の虚血状態を伴う疾患および障害ならびに該疾患および障害に起因する障害を治療および予防する方法を提供する。この組成物は、少なくとも1つのNF- κ Bのデコイ、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。

5

1つの実施形態において、本発明が対象とする疾患は、クモ膜下出血、高血圧性脳内出血、脳梗塞、脳虚血、脳腫瘍、頭部外傷、慢性硬膜下血腫および急性硬膜下血腫からなる群より選択される少なくとも1つの疾患であり得る。別の実施形態において、前記脳の虚血状態を伴う疾患および障害に起因する疾患および障害は、神経障害、運動障害、知能障害、痴呆、半身麻痺、頭痛および尿失禁からなる群より選択され得る。

10

別の実施形態において、上記薬学的に受容可能なキャリアは、薬学的に受容可能である任意のキャリアであり得るが、好ましくはリポソームであり得る。より好ましくは、本発明の薬学的組成物は、HVJ-リポソームの形態で提供され得る。

15

本発明において用いられるNF- κ Bのデコイは、配列GGATTTC CCを含む。より好ましくは、NF- κ Bのデコイは、CCTTGAAGGGATTTC CCTTC（配列番号1）を含み得る。別の実施形態では、NF- κ Bのデコイは、さらに改変された形態でもよい。

20

好ましい実施形態では、本発明の組成物および方法は、頸動脈を介する投与経路で投与され得る。

25

別の局面において、本発明は、脳への直接投与以外の経路により、脳での遺伝

子トランスフェクションを行う方法およびそのための組成物を提供する。この組成物は、少なくとも1つのデコイ、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。

好ましい実施形態において、脳への直接投与以外の経路は、頸動脈注入であり得る。脳への直接投与以外の経路での投与でのトランスフェクションに適切な遺伝子は任意の遺伝子であり得る。好ましくは、そのような遺伝子は、脳内での発現が効果を奏する遺伝子であり得る。そのような遺伝子としては、例えば、NF- κ B、STAT-1、GATA-3、STAT-6、AP-1、E2F、Ets、CREのデコイが挙げられる。好ましいデコイの例として、5'-CCT-TGAAGGGATTTCCTCC-3' (配列番号1) (NF- κ Bデコイ)、5'-GATCTAGGGATTTCGGGAAATGAAGCT-3' (配列番号2) (STAT-1のデコイ)、5'-AGCTTGAGATAGAGCT-3' (配列番号3) (GATA-3のデコイ)、5'-GATCAAGACCTTTTCCCAAGAAATCTAT-3' (配列番号4) (STAT-6のデコイ)、5'-AGCTTGTCAGTCAGAGCT-3' (配列番号5) (AP-1のデコイ)、および5'-AATTCACCGGAAGTATTCGA-3' (配列番号6) (Etsのデコイ)、5'-TGACGTCA-3' (CREのデコイ) またはこれらの相補体を含むオリゴヌクレオチド、これらの変異体、またはこれらを分子内に含む化合物が挙げられる。ここで、好ましい実施形態では、薬学的に受容可能なキャリアはリポソームであり得る。

本発明では、転写因子NF- κ Bを結合するシスエレメントデコイのインビボトランスフェクションを使用して全脳虚血後の神経損傷を和らげる証拠が示された。

1つの実施形態では、NF- κ BデコイODNは、頸動脈を介しておよび血液

脳関門を横切ってそれらを注入することによって首尾良くニューロンの核に導入される。TUNEL 標識 (DNA 切断) および MAP 2 (神経マーカー) の免疫反応性での評価によれば、このトランスフェクトされた NF- κ B デコイ ODN は、海馬において NF- κ B シグナルに関する遺伝子発現を抑制し、全脳虚血に
5 起因する神経損傷を和らげることが実証された。従って、本発明は、頸動脈を介する NF- κ B デコイ ODN を用いたニューロンのトランスフェクションは、全脳虚血中に虚血損傷から脳を保護するための新しい戦略を提供する。

従来の脳虚血の処置では、超低体温が用いられていた。超低体温は、脳のエネルギー要求を減らす循環停止中に脳保護に対する基本的な戦略である。しかし、
10 超低体温循環停止は、神経損傷の有害な危険を伴い、合併症 (発作、大脳麻痺、運動性機能不全、および記憶欠損など) を併発していた (Rappaport LA, Wypij D, Bellinger DC, Helmers SL, Holmes GL, Barnes PD ら、Circulation. 1998;
15 97:773-9; Bellinger DC, Jonas RA, Rappaport LA, Wypij D, Wernovsky G, Kuban KC ら、N Engl J Med. 1995; 332:549-55; および Reich DL, Uysal S, Sliwinski M, Ergin MA, Kahn RA, Konstadt SN ら、J Thorac Cardio
20 vasc Surg. 1999; 117:156-63 を参照のこと)。神経損傷 (壊死および遅延神経死を含む) は、これらの神経学的損傷の一つの原因である。
本発明による処置では、神経学的事象は、ラットにおいて示されず、組織学的研究は、脳切片において梗塞形成領域を示さなかった。コントロール群における虚血後 7 日のラットは、全て生存しているにもかかわらず、NF- κ B デコイ群に
25 ラットと比較して、学習能力が低下していたことが結論づけられた。神経損傷を和らげることにに関して、超低体温に加えて多くの方法が報告されている (Aok

i M, Jonas RA, Nomura F, Stromski ME, Tsuji MK, Hickey PRら、J Thorac Cardiovasc Surg. 1994;108:291-301を参照のこと)。しかし、これらの報告は、主にエネルギー要求および代謝の調節に集中し、そして一般的に臨床的な成功を証明することに失敗した。従って、他のメカニズムに基づく代替的方法（虚血再灌流損傷に関する遺伝子発現の調整など）が求められていた。本発明の方法はこのような課題をも解決した。

最近の報告では、アポトーシスが、循環停止後の遅延神経損傷において重要な役割を果たし得ることを示されている(Cheng Y, Deshumukh M, D'Costa M, Demaro JA, Gidday JM, Shah Aら、J Clin Invest 1998;101:1992-9;およびKurth CD, Priestley M, Golden J, McCann J, Raghupathi R., J Thorac Cardiovasc Surg. 1999;118:1068-77を参照のこと)。多くの分子シグナル（炎症関連サイトカインおよび接着分子を含む）がアポトーシスに関連する。これらの炎症関連因子は、NF- κ Bの転写活性化によって主にアップレギュレートされる。このNF- κ Bは、酸化ストレス反応性分子である。サイトカインmRNA (TNF- α およびIL-1 β など) レベルの調節が、直接神経損傷をブロックするかどうかは明らかではない。しかし、最小で、これらの炎症サイトカインは、虚血関連神経損傷の一因となる。本発明は、NF- κ Bが全脳虚血後の虚血再灌流損傷および神経損傷の減衰において重要な役割を果たし得ることを実証した。TUNEL染色は、DNA損傷およびDNAの修復を示し得る非特異的技術であり、そして壊死細胞においてでさえ陽性であり得る。従って、さらに他の検査を行った。本発明において、組織学的実験を行ったところ、全脳虚血後の2日でTUNEL陽性ニューロンが、総ニューロン中約15%（全脳虚血後の7日の

TUNEL陽性ニューロンより少ない)であることが実証された。神経損傷(壊死および遅延神経死の両方を含む)は、全脳虚血後の少なくとも2日と7日の間で生じる。

5 さらに、NF- κ Bは、多くの経路を介して働くと推測され、そしてこれらの経路はまた、全脳虚血後の神経損傷と関連し得る。これらのメカニズムには、以下が包含される:(1) NF- κ B活性化は、多くの組織(脳を含む)においてフリーラジカル損傷を部分的に媒介すること(Schreck R, Rieber P, Baueerle PA., EMBO J. 1991;10:2247-5
10 8を参照のこと);(2) NF- κ B活性化は、グルタミン酸細胞毒性の原因となると思われること(Grilli Mら、1996、前出を参照のこと);(3) NF- κ Bは、誘導硝酸シンターゼおよびサイクロオキシゲナーゼ2のアップレギュレーションにおいて機能すること(Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Riehemann K, Wesselborg S.,
15 Immunobiology. 1997;198:35-49を参照のこと);ならびに(4) NF- κ Bは、遅延神経損傷を起こすCD95リガンドの活性化を媒介し得ること(Vogt M, Bauer MK, Ferarri D, Schulze-Osthoff K., FEBS Lett. 1998;429:67-72を参照のこと)。これらのメカニズムは、全てNF- κ BデコイODN
20 方法の可能な標的である。従って、本発明は、上記の少なくとも1つのメカニズムに作用することによって神経損傷を処置および予防する組成物および方法を提供する。

さらに、NF- κ Bに対する標的遺伝子は、アポトーシス関連遺伝子(TP 5
25 3 (Wu H, Lozano G., J Biol Chem. 1994, 269:20067-74を参照のこと) およびc-myc (LaRosa FA,

Pierce JW, Sonenshein GE., Mol Cell Biol. 1994; 14: 1039-44を参照のこと)を含む)を含む。従って、NF- κ B結合部位に接するデコイODNを使用する本発明の遺伝子治療は、炎症応答に関する遺伝子発現および次いで神経損傷（アポトーシスを含む）を抑制

5 することで虚血中の神経保護に対する新しい戦略を提供する。

多くの研究者は、脳保護のために遺伝子治療を使用することについての戦略を報告した（Hagihara Y, Saitoh Y, Kaneda Y, Kohmura E, Yoshimine T., Gene Ther. 2000; 7: 759-63; およびOno S, Date I, Onoda K, Shiota T, Ohmoto T, Ninomiya Yら, Hum Gene Ther. 1999; 10: 335)を参照のこと)。これらの報告において、遺伝子は、クモ膜下の空間または脳室に注入された。しかし、研究は、頸動脈を介する注入による効果的な遺伝子トランスフェクションを示さなかった。これは、血

15 液脳関門が、多くの外来物質および微生物の侵入を防ぐためである。しかし、全脳虚血中および後、血液脳関門を介する透過性が増大し; 事実、血液脳関門の軽減が、虚血後6時間まで継続することが報告された（Preston E, Foster DO., Brain Res. 1997; 761: 4-10を参照のこと)。本発明者らは、ニューロンをデコイODNでトランスフェクションすることにおける本発明者らの成功は、脳組織におけるHIV-1リポソーム複合体の累積のためであると考え。本発明者らの知識の及ぶ限りでは、これは、頸動脈を介するおよび血液脳関門を横切る遺伝子トランスフェクションの成功した最初の報告である。このような効果は、従来技術では達成できなかった、患者により安全

20 25 25

でかつ快適な治療を提供するものである。

デコイ治療は、多くの利益（即時効果、低コスト、およびほとんどない合併症

を含む)を有し、そして裸のE2Fデコイを用いる遺伝子治療は、静脈移植疾患を予防するために臨床的設定ですでに試みられている(Mann MJ, Whittimore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JFら., Lancet. 1999;354:1493-8を参照のこと)。しかし、本発明において、頸動脈を介する裸のODNのトランスフェクションは、脳においてその有効性に限定があることから、より安全なベクターが利用され得る。従って、頸動脈を介するHVJ-リポソームまたは他のベクターを用いたNF- κ Bデコイ治療の臨床的適用は、循環停止中の虚血損傷からの脳保護に有用である。脈管を介するNF- κ BデコイODN治療は、脳保護のための臨床的使用において広い適用(大脳麻痺の逆行再灌流など)の可能性を有し得る。

要約すると、本発明の結果は、全脳虚血中のNF- κ BデコイODNの投与が、ラットモデルにおいて海馬CA1領域における神経損傷を和らげることを示す。従って、頸動脈を介するNF- κ BデコイODN投与は、全脳循環停止中のニューロンを保護し得、NF- κ BデコイODNが、全体的虚血から脳を保護するための将来有望な治療的薬剤になり得る可能性を掲げる。本発明では、脳に対する遺伝子トランスフェクションのこの方法は、心臓外科の分野以外にも、神経外科・脳外科のような他の分野においても適用可能であることが実証されたことになる。このように、デコイの脳神経分野での応用が示されたことは顕著な効果であり、その有用性は筆舌に尽くしがたい。

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、実施例のみに限定されるものではなく、請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

(実施例1：HVJウイルスーリボソーム複合体の調製)

HVJーリボソーム複合体を、文献に記載のように調製した (Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Nat Med. 1997; 3: 894-9)。
概略をいうと、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルコリン (PC) およびコレステロール (Chol) を、1:4:8:2の重量比で混合した。この脂質混合物 (10mg) を、ロータリーエバポレーターで溶媒 (テトラヒドロフラン) を除去することでフラスコの側面に沈殿させた。乾燥した脂質を、200 μ gのODNを有する200 μ Lの生理的食塩水で水和した。リボソームを、振とうおよび音波破壊で調整した。リボソーム懸濁液 (10mgの脂質を含有する0.5mL) を、総容量4mLの生理的食塩水中で不活化したHVJ (10000血球凝集ユニット) と混合した。混合物を、4℃、5分でインキュベートし、
次いで穏やかな振とうで30℃で30分インキュベートした。自由HVJを、密度勾配遠心分離によってHVJーリボソームから除去した。スクロース勾配の最上層を、使用するために収集した。ホスホロチオエートODNの配列は、以下：
NF- κ BデコイODN、5'-CCTTGAAGGGATTTCCTCC-3' (配列番号1)、および3'-GGAACCTTCCTAAAGGGAGG-5' (配列番号7)；スクランブルデコイ (scrambled decoy) ODN、5'-TTGCCGTACCTGACTTAGCC-3' (配列番号8)、および3'-AACGGCATCCACTGAATGGG-5' (配列番号9) である。

(実施例2：全脳虚血モデルの作製およびモデル作製の評価)

本発明者らは、鎖骨下頸動脈の閉塞技術の改変技術を使用して、ラット全脳虚

血-再灌流モデルを樹立した (Torre J C, Fortin T., Brain Res Bull. 1991; 26: 365-72.). 300g~500g 体重の雄 Sprague-Dawley ラットを使用した。全ての動物は、大阪大学医学部動物施設 (the Institute of Laboratory Animal Resources in the Osaka University Medical School) が作成した「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」に従って世話をした。各ラットに、50mg/kg ペントバルビタール腹腔内投与で麻酔をかけ、そして口に挿管した。齧歯類用換気機を 35mmHg の P_{CO_2} を維持するように 10mL/kg 容量および 50~60 ストローク/分 で取りつけた。実験中、ラットは、脳以外の部分を加熱ブランケットで 36℃ に保温した。開胸後、胸腺の左葉を除去した。その大動脈弓を同定し、そして無名動脈、左総頸動脈、および左鎖骨下動脈を、50 ナイロン縫合糸で縫合した。右総頸動脈を、首の中で曝露しそしてポリエチレンチューブ (PE10, Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, NJ) のカニューレを挿入した。全脳虚血を、全ての 3 縫合動脈を 20 分間クランプすることで誘導した。

(実施例 3 : 脳虚血中の NF- κ B デコイオリゴデオキシヌクレオチドのトランスフェクション)

動脈をクランプした後直ぐに、NF- κ B デコイ ODN (NF デコイ群) またはスクランブルデコイ ODN (S デコイ群) のいずれかを含む HVJ-リポソーム複合体を、脳組織に行き渡らせるために右頸動脈に注入した。これらの薬物を、4℃ で保管し、そして 1 動物当たり 2mL を注入した。この手法において咽頭温度は、35.2℃ ± 0.2℃ から 33.1℃ ± 0.5℃ へ低下した。神経学的事象は、外科的手法後のいずれの動物においても観察されなかった。

全体的虚血-再灌流脳を、3つの方法で評価した。初めに、3匹のラットを再灌流後1時間で屠殺し、そして脳切片を、フルオレセインイソチオシアネート(FITC) 標識したODN送達のトランスフェクションを蛍光顕微鏡で観察することにより検査した。次に、各群から5匹のラットを、再灌流後1時間で屠殺し、そしてCA1領域を含む海馬を収集して、NF- κ Bによって活性化されることが知られるメッセンジャーRNAの発現に対するトランスフェクトされたNF- κ BデコイODNの効果を試験した。血管を剥ぎ取った後、サンプルは20mg~25mgの重量であった。第3に、各群から10匹のラットを、全脳虚血後7日

5
10

で屠殺し、神経損傷を調査するため末端デオキリヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介デオキシウリジン三リン酸ニック末端標識(TUNEL) 染色または微小管結合タンパク質2(MAP2) による免疫組織化学による組織学検査を行った。

15 (インビボでの全脳虚血中の頸動脈を介するNF- κ BデコイODNのトランスフェクション)

本発明者らの予備的な研究において、本発明者らは、全脳虚血中に、いずれのベクターも使用せず裸のFITC-標識NF- κ B ODNを頸動脈に注入した。しかし、この方法を使用することによって、蛍光は、脳組織中に検出されなかった(データは示さない)。次に本発明者らは、脳組織中にNF- κ BデコイODNをトランスフェクトするためのHVJ-リボソーム方法を使用することを試みた。再灌流後1時間で、試験された全てのラットにおいて、本発明者らは、FITC標識ODNを有する細胞のトランスフェクションを、内膜動脈においでだけでなく、ニューロン(特に皮質および海馬のニューロン) においてもまた観察した(図

20
25

1)。蛍光は、主に細胞核に対して局在された。従って、本発明者らのモデルにおいて、NF- κ BデコイODNを、全脳虚血中に血液脳関門を介して脳組織へと

ランスフェクトし得た。

(結果)

全脳虚血中の頸動脈を介するNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドの
5 ラット脳神経への導入は、明らかに成功した。ポリメラーゼ連鎖反応は、トランス
フェクトされたNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドが、全脳虚血後
1時間で効果的に腫瘍壊死因子 α 、インターロイキン1 β 、および細胞内接着分
子1 メッセンジャーRNAの発現を阻害することを示した。末端デオキシリヌク
レオチジルトランスフェラーゼ媒介デオキシウリジン三リン酸ニック末端標識染
10 色および微小管結合タンパク質2免疫組織化学は、トランスフェクトされたNF
- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドが、全脳虚血後7日で、有意に神経損
傷を和らげることを示した。

(海馬におけるTNF- α 、IL-1 β 、およびICAM-1 mRNAの定
15 量)

次に、本実施例では海馬におけるTNF- α 、IL-1 β 、およびICAM-
1 mRNAの定量を行った。

本発明者らは、実時間ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)システムを使用して、
20 再灌流後1時間でNF- κ Bのシグナルに応答することが知られる遺伝子の発現
に対する、NF- κ BデコイODN対SデコイコントロールODNのインビボで
のトランスフェクションの効果を調査した。この技術をもちいることにより、相
補DNA増幅の定量を行った。蛍光ベースの実時間PCR次いでABI PRIS
SM 7700 Sequence Detection System (Bi
25 osystems, Foster City, Calif., USA)を用いた増
幅の測定を含む。

概略すると、総RNAを、メーカーの指示 (Qiagen, Hilden, Germany) に従い、RNAeasy Mini Kitを使用して各20mg~25mg海馬サンプルから精製した。そのRNAサンプルを、液体窒素で凍結し、そして使用まで-80℃で保管した。遺伝子転写に対する試験をするため、2μgのRNAを、メーカーによって推奨される総容量40μLで、RNase-H-陰性 モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (SUPERSCRIP T 2, Gibco BRL, Life Technologies, Inc, Rockville, Md) を用いて逆転写した。cDNAの1/80を、各PCR反応のため使用し、そして各転写の測定を、3倍で実施した。実時間PCRの技術は、Taqポリメラーゼの5'-エンドヌクレアーゼ活性による各増幅サイクルで特異的蛍光プローブの加水分解に基づく。この技術は、いくつかの改変を有するが、Depreら (Depre C, Shipley GL, Chen W, Han Q, Doenst T, Moore Mら, Nat Med. 1998; 4: 1269-75を参照のこと) によって記載されたように実施される。フォワードプライマー、リバースプライマー、およびプローブのヌクレオチド配列は、以下のとおりである:

TNFα順向きプライマー CCACCACGCTCTTCTGTCTACT (配列番号10)、
20 逆向きプライマー TTGGTGGTTTGGGACGACGT (配列番号11)、
およびプローブ CCCAGACCCTCACACTCAGATCATCTTC (配列番号12);

IL-1β:

順向きプライマー CCACCTCAATGGACAGAACATAAG (配列番号13)、
25

逆向きプライマー GACAAACCGCTTTTCCATCTTC (配列

番号14)、および

プローブ CAAGGAGAGACAAGCAACGACAAAATCCC
(配列番号15);

ICAM-1:

5 順向きプライマー TTCAAGCTGAGCGACATTGG (配列番号
16)、

逆向きプライマー TCAGTGTCTCATTTCCCAAGCA (配列番
号17)、および

10 プローブ TCTGCCACCATCACTGTGTATTTCGTTCC
(配列番号18)。

ここでアッセイされた各分子に対して、プライマー対、または少なくとも1つのプライマーもしくはプローブを、1つ以上のイントロンをまたぐように設計し、それによってmRNAのみを測定した。事実、ゲノムDNAを標的として使用する
15 場合、いずれの分子に対してもシグナルは検出されなかった。プライマーおよびプローブを、各PCR反応において200mmol/Lで使用し、そしてPCRを、95℃での15秒変性工程および60℃での1分アニーリング工程の50
サイクルで実施した。各測定において生じる標準曲線の相関係数は、いつも0.97またはそれよりも良く、そして3倍のサンプルにおける変動係数は、通常1
20 0%以下であった。分光測定法を用いたRNA濃度の測定において精度の相対的に不足していたことから、細胞性酵素グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)による転写のレベルを、各サンプルにおいて内部コントロールとして量的に測定した。GAPDHプライマーおよびプローブ配列は、以下のとおりであった:

25 順向きプライマー、CCATCACTGCCACTCAGAAGAC (配列番号19);

逆向きプライマー、TCATACTTGGCAGGTTTCTCCA（配列番号20）；および

プローブ、CGTGTTCTACCCCCCAATGTATCCGT（配列番号21）。

- 5 mRNA/GAPDH値を、各サンプルに対して計算し、次いで正常のラットmRNA/GAPDHレベルと比較した誘導値を算出した。

（結果）

（海馬におけるTNF- α 、IL-1 β およびICAM-1 mRNA発現）

- 10 NFデコイ群において、再灌流後1時間でのTNF- α をコードする遺伝子の発現の誘導率の倍率は、正常細胞における速度と比較して 2.8 ± 1.1 であり、ところがSデコイ群において誘導率の倍率は、 12.5 ± 2.2 であった。再灌流後1時間でのIL-1 β およびICAM-1 mRNA発現の誘導率の倍率は、それぞれ、NFデコイ群においては 4.7 ± 1.7 および 3.5 ± 0.5 、なら
- 15 びにSデコイ群においては 14.0 ± 7.5 および 25.7 ± 12.0 であった（図2）。これらの3遺伝子の発現は、NF- κ Bによって活性化され、そして頸動脈を介するNF- κ BデコイODNのトランスフェクションによって効果的に抑制される（それぞれ、 $P=0.01$ 、 $P=0.01$ 、および $P=0.1$ ）。これらのデータは、トランスフェクトされたNF- κ BデコイODNが、海馬中の虚
- 20 血再灌流損傷におけるNF- κ Bに関する遺伝子発現を効果的にブロックすることを実証した。

（実施例4：海馬CA1領域におけるNF- κ BデコイODNによる神経損傷の遮断）

- 25 次に、本実施例において、海馬CA1領域におけるNF- κ BデコイODNによる神経損傷の遮断を組織化学的に評価した。

(TUNEL染色および免疫組織化学)

全脳虚血後1週間で正常なマウスにおいて、特に海馬のCA1領域において虚血損傷が検出され得、そしてTUNEL-陽性ニューロンの数が増加することが分かっている (Jonas RA. Hypothermia, circulatory arrest, and the pediatric brain. J Cardiothorac Vasc Anesth. 1996;10:66-74)。TUNEL-陽性ニューロンの存在は、直接アポトーシスの発生を示さないが、DNA損傷を示す。MAP2の発現レベル (細胞骨格性タンパク質は、虚血損傷のマーカーで、そしてその発現において減少する) を、全脳虚血後に観察した (Vanickey I, Baichen T, Diemer NH., Neuroreport. 1995;7:161-4)。神経虚血損傷に対して、NF- κ BデコイODNのトランスフェクトの効果を評価するために、脳を、速やかに液体窒素で凍結し、そして海馬の吻側尾側の (rostrocaudal) 伸長を介して環状に切断する。TUNEL染色に対して、5 μ m切片を、1%パラホルムアルデヒド中に固定する。TUNEL染色を、メーカーにより推奨されるようにApopTag In Situ Apoptosis Detection Kit (Intergen Co, Purchase, NY) を用いて実施した。反応産物を、3, 3'-ジアミノベンジジンおよびH₂O₂を用いた展開によって視覚化した。TUNEL染色した脳切片を、またヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色した。次いで、各ラットにつき3切片についてCA1領域 (500 μ m長) においてTUNEL陽性であるニューロンの総数のパーセンテージを算出した。

免疫組織化学を、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼシステム (ABC kit; Vector Laboratories, Inc, Burlingam

e、Calif)を使用することで脳切片に対して実施した。5 μ m切片を、2%パラホルムアルデヒド中に固定し、そしてモノクローナルMAP2抗体 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) と共に一晩4℃でインキュベートした。切片を、メーカーの推奨に従ってABC免疫ペルオキシダーゼシステムを使用して染色した。反応産物を、3,3'-ジアミノベンジジンおよびH₂O₂を用いた展開によって視覚化し、これらの切片をまたヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色した。MAP2-陽性ニューロンの数を、各ラットにつき3切片についてCA1領域(500 μ m長)において計数した。

10

(統計解析)

データを、平均±標準偏差として示した。2群間の統計学的有意差を、Mann-Whitney Uテストで計算した。

15

(結果)

(海馬CA1領域におけるNF- κ BデコイODNによる神経損傷の遮断)

次に、全脳虚血後7日で組織学的に評価して、脳組織を、神経損傷に対するNF- κ BデコイODNの保護効果を測定した。TUNEL-陽性ニューロンを、両半球において検出し、右半球において神経損傷を評価した。

20

NFデコイ群において、全脳虚血後7日で、Sデコイ群と比較してTUNEL-陽性ニューロンはより少なくなった(NFデコイ群において、11.3%±13.1%、Sデコイ群において、40.3%±18.0%、P=0.003; 図3)。MAP2-陽性ニューロンの数は、Sデコイ群においてよりもNFデコイ群において高くなった(NFデコイ群において、96.4±33.0細胞/500 μ m長、Sデコイ群において、50.6±23.8細胞/500 μ m長、P=0.

25

005 ; 図4)。これらのデータは、頸動脈を介してNF- κ Bをニューロンにトランスフェクトすることが、全脳虚血後の神経損傷を和らげたことを示す。

(結論)

- 5 脳虚血中のNF- κ Bデコイオリゴデオキシヌクレオチドの治療的トランスフェクションは、神経損傷を和らげるために有効であり、脳虚血に対する大脳および神経の保護に有効であることが示された。

- 10 (実施例5：他のデコイの頸動脈への投与による脳内遺伝子トランスフェクション)

- 次に、他の遺伝子でも脳血液関門を通過した後に脳内で遺伝子トランスフェクションが行われることを実証するために、例として、STAT-1のデコイ(5'-GATCTAGGGATTTCCGGGAAATGAAGCT-3'(配列番号2))、GATA-3のデコイ(5'-AGCTTGAGATAGAGCT-3'(配列番号3))、STAT-6のデコイ(5'-GATCAAGACCTTTTCCCAAGAAATCTAT-3'(配列番号4))、AP-1のデコイ(5'-AGCTTGTGAGTCAGAAGCT-3'(配列番号5))およびEtsのデコイ(5'-AATTCACCGGAAGTATTCGA-3'(配列番号6))を用いた。

20

上記デコイについて、実施例1の記載に従って、HVJウイルスーリボソーム複合体を調製した。

- 25 本発明者らは、全脳虚血中に、いずれのベクターも使用せず裸のFITC-標識した上記各デコイODNを頸動脈に注入した。しかし、この方法を使用しても、蛍光は、脳組織中に検出されなかった(データは示さない)。次に本発明者らは、

- 脳組織中に上記各デコイODNをトランスフェクトするためのH.V.Jーリポソーム方法を使用することを試みた。再灌流後1時間で、試験された全てのラットにおいて、本発明者らは、FITC標識ODNを有する細胞のトランスフェクションを、内膜動脈においだけでなく、ニューロン（特に皮質および海馬のニューロン）においてもまた観察した（データは示さない）。蛍光は、主に細胞核に対して局在された。従って、本発明者らのモデルにおいて、NF- κ B以外の上記各デコイODNでも、全脳虚血中に血液脳関門を介して脳組織へトランスフェクトし得ることが明らかになった。
- 5
- 10 本実施例は、どのようなデコイでも、血液脳関門を介した脳内トランスフェクションが可能であることを実証した。

産業上の利用可能性

- デコイを用いて脳における虚血に起因する疾患または障害を処置または予防する薬学的組成物が提供される。本発明の薬学的組成物の脳以外での投与によって脳での遺伝子トランスフェクションを達成したことは、非侵襲的であって、繰り返し可能な脳の治療および予防の方法を提供し得る。
- 15

請求の範囲

1. 脳の虚血状態を伴う疾患および障害ならびに該疾患および障害に起因する障害を治療および予防するための薬学的組成物であって、
- 5 少なくとも1つのNF- κ Bのデコイ、および
薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物。
2. 前記疾患は、クモ膜下出血、高血圧性脳内出血、脳梗塞、脳虚血、脳腫瘍、頭部外傷、慢性硬膜下血腫および急性硬膜下血腫からなる群より選択される少なく
- 10 とも1つの疾患である、請求項1に記載の組成物。
3. 前記脳の虚血状態を伴う疾患および障害に起因する疾患および障害は、神経障害、運動障害、知能障害、痴呆、半身麻痺、頭痛および尿失禁からなる群より選択される、請求項1に記載の組成物。
- 15 4. 前記薬学的に受容可能なキャリアがリポソームである、請求項1に記載の組成物。
5. 前記NF- κ Bのデコイは、配列GGATTTC CCを含む、請求項1に
- 20 記載の組成物。
6. 頸動脈を介する投与経路に適切である、請求項1に記載の組成物。
7. 脳への直接投与以外の経路により、脳での遺伝子トランスフェクションを
- 25 行うための組成物であって、
少なくとも1つのデコイ、および

薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物。

8. 前記脳への直接投与以外の経路は、頸動脈注入である、請求項7に記載の組成物。

5

9. 前記デコイは、NF- κ Bである、請求項7に記載の組成物。

10. 前記薬学的に受容可能なキャリアはリポソームである、請求項7に記載の組成物。

10

11. 脳の虚血状態を伴う疾患および障害ならびに該疾患および障害に起因する障害を治療および予防するための方法であって、

少なくとも1つのNF- κ Bのデコイ、および

薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物を被検体に投与する工程、

15 を包含する、方法。

12. 前記疾患は、クモ膜下出血、高血圧性脳内出血、脳梗塞、脳虚血、脳腫瘍、頭部外傷、慢性硬膜下血腫および急性硬膜下血腫からなる群より選択される少なくとも1つの疾患である、請求項11に記載の方法。

20

13. 前記脳の虚血状態を伴う疾患および障害に起因する疾患および障害は、神経障害、運動障害、知能障害、痴呆、半身麻痺、頭痛および尿失禁からなる群より選択される、請求項11に記載の方法。

25 14. 前記薬学的に受容可能なキャリアがリポソームである、請求項11に記載の方法。

15. 前記NF- κ Bのデコイは、配列GGATTTCCCを含む、請求項11に記載の方法。

5 16. 頸動脈を介する投与経路に適切である、請求項11に記載の方法。

17. 脳への直接投与以外の経路により、脳での遺伝子トランスフェクションを行う方法であって、

少なくとも1つのデコイ、および

10 薬学的に受容可能なキャリアを、脳への直接投与以外の経路に適切な形態で含む、組成物、を被検体に投与する工程、
を、包含する、方法。

18. 前記脳への直接投与以外の経路は、頸動脈注入である、請求項17に記載の方法。

19. 前記デコイは、NF- κ Bである、請求項17に記載の方法。

20 20. 前記薬学的に受容可能なキャリアはリポソームである、請求項17に記載の方法。

1
2x

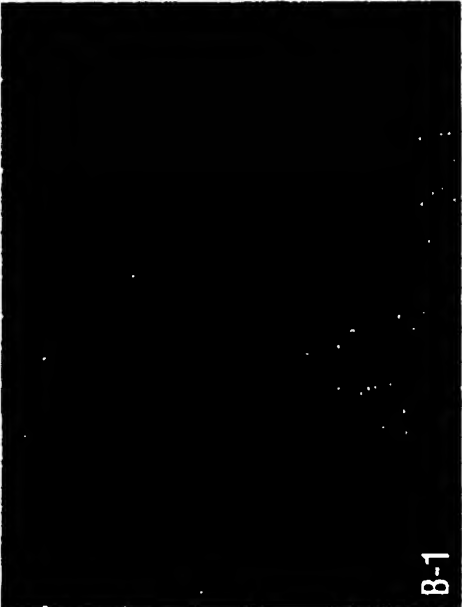
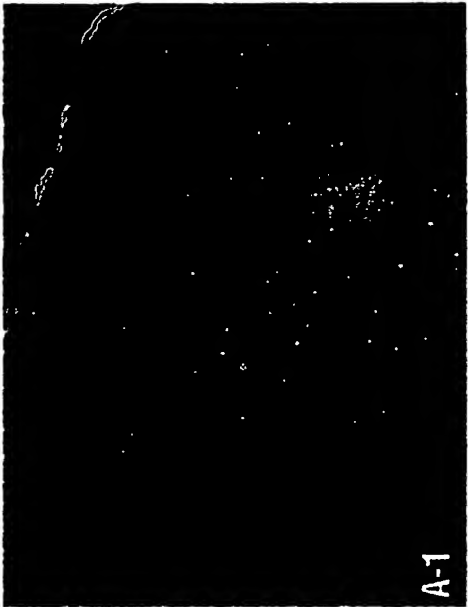
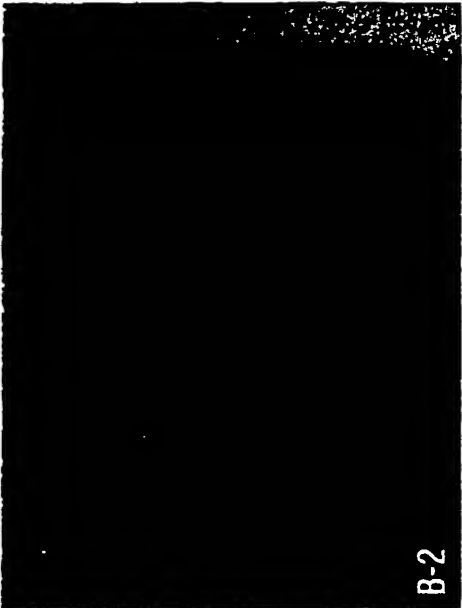
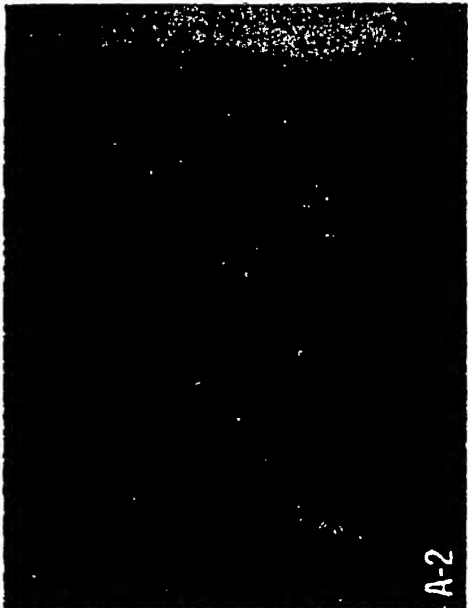


図2

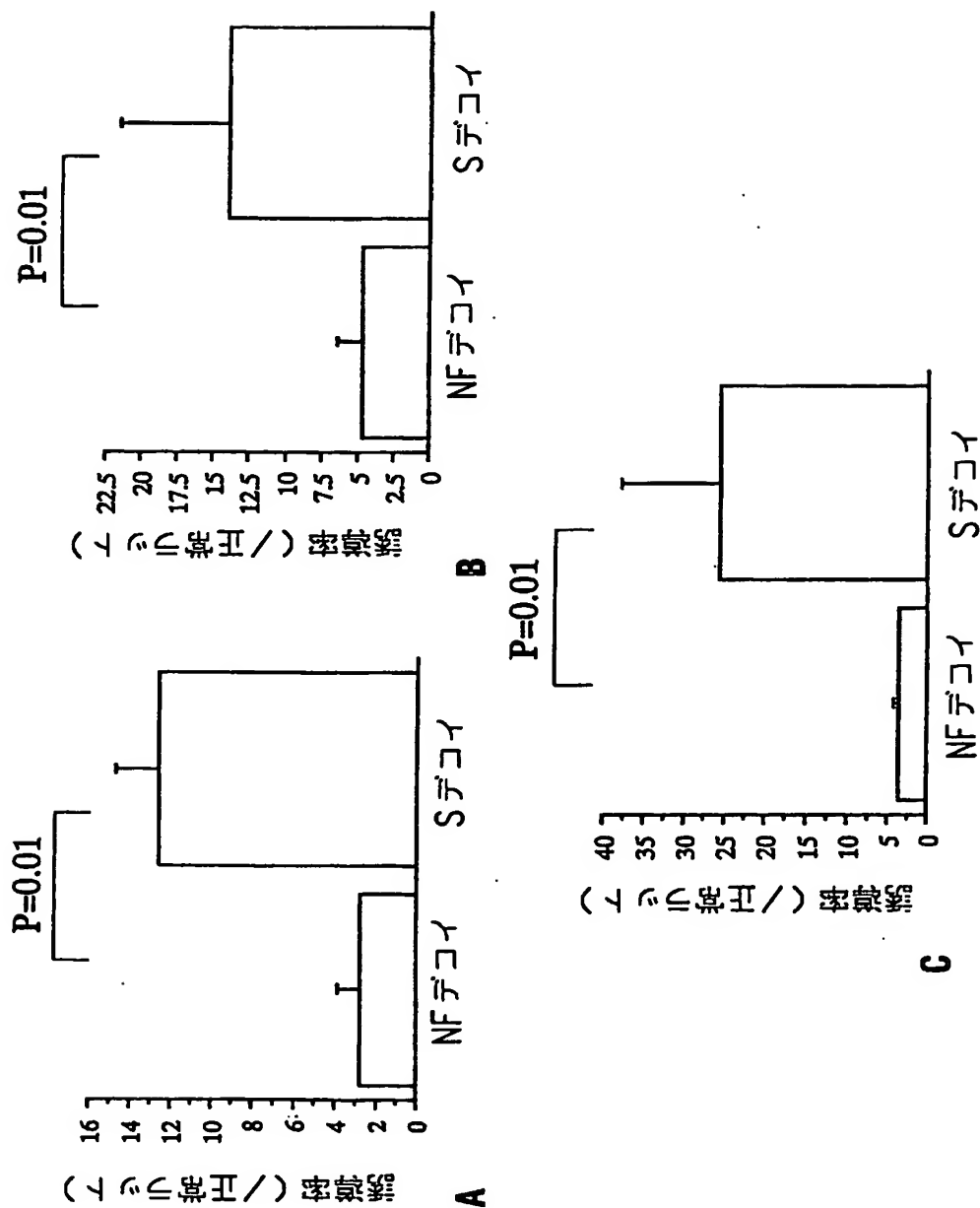


図3

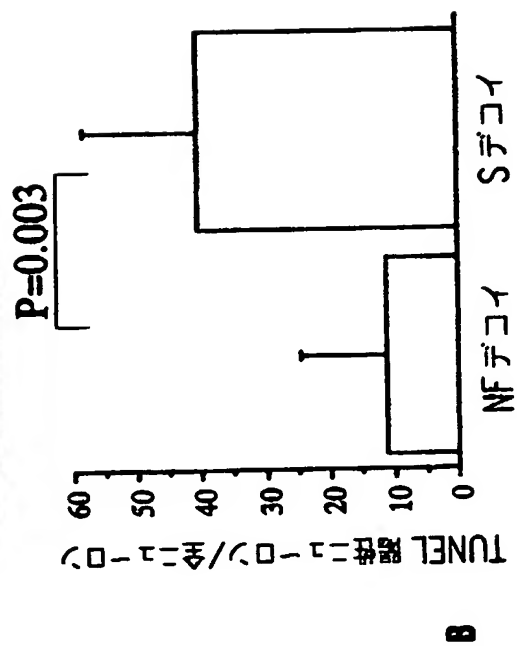
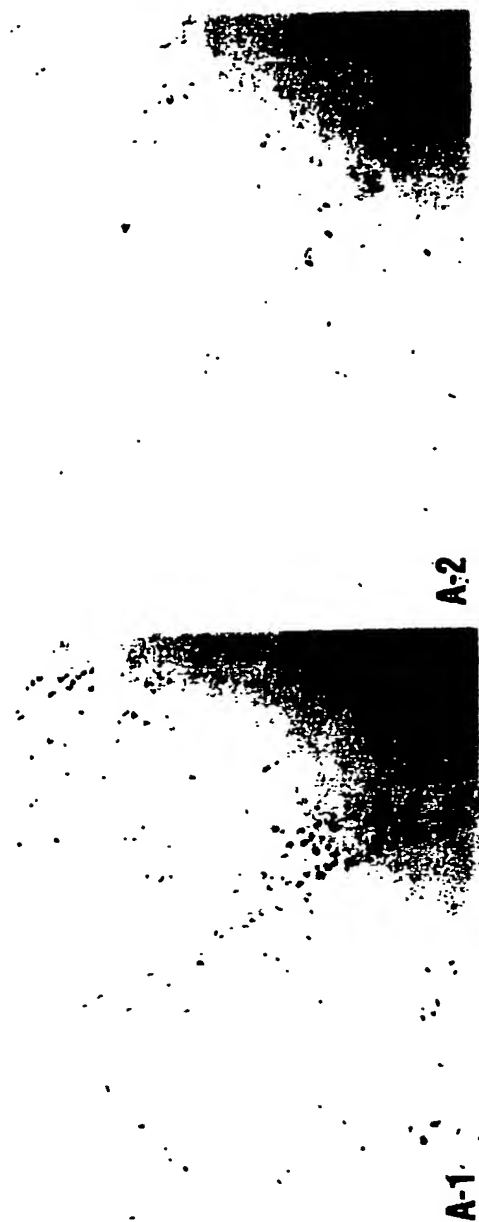
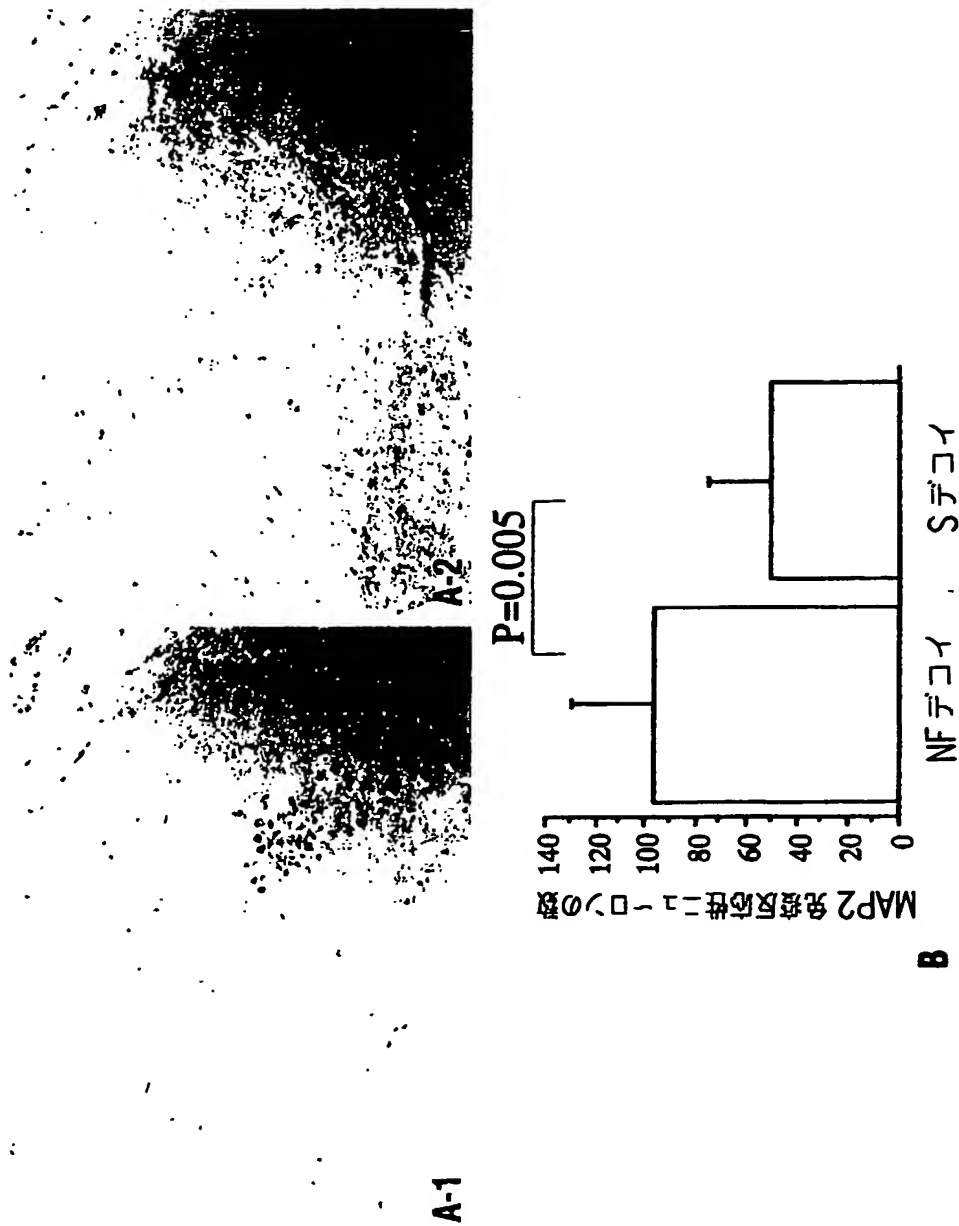


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> AnGes-MG, Inc.

<120> NFkappaB decoy composition for treating and preventing brain ischemic diseases and disorders

<130>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: NF-kappaB decoy

<300>

<400> 1

ccttgaaggg atttcctcc

20

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: STAT-1 decoy

<400> 2

gatctaggga ttccgggaa atgaagct

28

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: GATA-3 decoy

<400> 3

agcttgagat agagct

16

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: STAT-6 decoy

<400> 4

gatcaagacc ttttcccaag aaatctat

28

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: AP-1 decoy

<400> 5

agcttgtgag tcagaagct

19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Ets decoy

<400> 6

aattcaccgg aagtattcga

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: NF kappa B decoy ODN

<400> 7

ggaacttccc taaagggagg

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: scrambled decoy ODN

<400> 8

ttgccgtacc tgacttagcc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: scrambled decoy ODN

<400> 9

aacggcatcc actgaatggg

20

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TNF alpha forward primer

<400> 10

ccaccacgct cttctgtcta ct

22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TNF alpha reverse primer

<400> 11

tgggtgggtt gggacgacgt 20

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TNF alpha probe

<400> 12

cccagaccct cacactcaga tcattctt

28

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: IL-1beta forward primer

<400> 13

ccacctcaat ggacagaaca taag

24

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: il-1beta reverse primer

<400> 14

gacaaaccgc tttccatct tc

22

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: il-1beta probe

<400> 15

caaggagaga caagcaacga caaaatccc

29

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ICAM-1 forward primer

<400> 16

ttcaagctga gcgacattgg

20

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ICAM-1 reverse primer

<400> 17

tcagtgtctc attcccaagc a

21

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ICAM-1 probe

<400> 18

tctgccacca tcactgtgta ttcgttcc

28

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: GAPDH forward primer

<400> 19

ccatcactgc cactcagaag ac

22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: GAPDH reverse primer

<400> 20

tcatacttgg caggtttctc ca

22

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: GAPDH probe

<400> 21

cgtgttcccta cccccaatgt atccgt

26

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年03月28日（28.03.2002）木曜日 15時20分17秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 アンジェス エムジー株式会社は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のよう に開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i) VIII-5-1 (ii) VIII-5-1 (iii) VIII-5-1 (iv)	開示の種類 開示の日付： 開示の名称： 開示の場所：	刊行物 2001年10月01日（01.10.2001） Nuclear factor-kB decoy attenuates neuronal damage after global brain ischemia: A future strategy for brain protection during circulatory arrest, The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Volume 122, Number 4, October 2001, pp 720-727
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。：	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/03239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/711, A61P25/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/711, A61P25/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	UENO, Takayoshi et al., Nuclear factor- κ B decoy attenuates neuronal damage after global brain ischemia: A future strategy for brain protection during circulatory arrest, Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2001, Vol.122, No.4, pages 720 to 727, full text; particularly, abstract; Figs. 1 to 4	1-10
X Y	EP 1008352 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 14 June, 2000 (14.06.00), Full text; particularly, Claims 1 to 4; Par. No. [0017]; examples & WO 99/01155 A1	1-4 1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
03 June, 2002 (03.06.02)

Date of mailing of the international search report
02 July, 2002 (02.07.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 824918 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 25 February, 1998 (25.02.98), Full text; particularly, Claims 1 to 4; page 2, lines 35 to 40; examples 1 to 3 & WO 96/35430 A1	1-5 1-5
X	WO 96/22112 A1 (Genetic Therapy Inc.), 25 July, 1996 (25.07.96), Full text; particularly, Claims 1 to 6; page 14, lines 28 to 32	7,8,10
A	BLONDEAU, Nicolas et al., Activation of the nuclear factor- κ B is a key event in brain tolerance, Journal of Neuroscience, 2001, Vol.21, No.13, pages 4668 to 4677	1-5

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-20

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 11 to 20 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Considering claim 1 of the present case as a specified invention, it is recognized that the matter common to claim 7 resides in "delivering a decoy to the brain". As described in the following documents, "delivering a decoy to the brain" had been publicly known. Thus, this constitution can be neither regarded as a novel matter nor considered as the major part of the invention.

The invention as set forth in claim 7 in the present case relates to "a composition for the gene transfection in the brain via a route other than the direct administration to the brain which contains at least one decoy and a pharmaceutically acceptable carrier". It is recognized that the task of this invention resides in the transfection of a non-specific decoy to the brain via a route other than the direct administration. Thus, it has no characteristic other than the administration route and, therefore, differs in task from the invention as set forth in claim 1 which aims at treating a specific disease (i.e., brain ischemia) with the use of a specific active ingredient (i.e., NF- κ B decoy). Therefore, it cannot be recognized that these inventions have a technical task in common which had not been solved until the application.

Such being the case, the group of the inventions as set forth in claims 7 to 10 and the group of the inventions as set forth in claims 1 to 6 cannot be regarded as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/711, A61P25/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/711, A61P25/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2002年
日本国登録実用新案公報	1994-2002年
日本国実用新案登録公報	1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	BIOSIS (STN)
REGISTRY (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	UENO, Takayoshi et al, Nuclear factor- κ B decoy attenuates neuronal damage after global brain ischemia: A future strategy for brain protection during circulatory arrest, Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2001, Vol. 122, No. 4, pp720-727, 全文, 特にAbstract, Fig. 1-4	1-10
X	EP 1008352 A1 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2000.06.14	1-4
Y	全文, 特に請求項1-4, 段落番号【0017】, 実施例 & WO 99/01155 A1	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.06.02

国際調査報告の発送日

02.07.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希



4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C. (続き)	関連すると認められる文献	関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリ *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	EP 824918 A1 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 1998. 02. 25	1-5
Y	全文, 特に請求項1-4, 第2頁第35-40行, 実施例1-3 & WO 96/35430 A1	1-5
X	WO 96/22112 A1 (GENETIC THERAPY INC.) 1996. 07. 25 全文, 特に請求項1-6, 第14頁第28-32行	7, 8, 10
A	BLONDEAU, Nicolas et al, Activation of the nuclear factor- κ B is a key event in brain tolerance, Journal of Neuroscience, 2001, Vol. 21, No. 13, pp4668-4677	1-5

第I欄 請求の範囲の一部の調査が要しないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲11-20は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

本願の請求の範囲1を特定発明とみると、請求の範囲7との共通部は「デコイを脳に到達させる」ことであると認められるところ、下記文献に記載のとおり「デコイを脳に到達させる」ことは公知であるため、当該構成は新規な事項とは認められず、発明の主要部とみることができない。

また、本願の請求の範囲7に係る発明は、「脳への直接投与以外の経路により脳での遺伝子トランスフェクションを行うための組成物であって、少なくとも1つのデコイ、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物。」であり、当該発明は、不特定のデコイを直接投与以外の経路で脳にトランスフェクトすることを課題とするものであると認められるところ、投与経路には特徴がなく脳の虚血という特定の疾患をNF- κ Bのデコイという特定の有効成分により治療することを目的とする請求の範囲1とは課題が相違するため、両者が出願時まで未解決であった技術上の共通の課題を持つものとも認められない。

してみれば、本願の請求の範囲7-10に係る発明は、請求の範囲1-6に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.